

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉMILE ROUX

1853-1933

Le Docteur Roux est mort le 3 novembre 1933.

Le pays lui a fait, le 9 novembre, des funérailles nationales. Les troupes ont présenté les armes et les drapeaux se sont inclinés devant le cercueil. La cérémonie religieuse à Notre-Dame a été émouvante par la grandeur et la simplicité. Sur le parvis, dans l'espace solennel encadré par les enfants des écoles, tandis que des formes blanches d'étudiants et d'infirmières se pressaient aux fenêtres et jusque sur les toits de l'Hôtel-Dieu, notre Maître a reçu, en présence des grands corps de l'État, l'hommage du Gouvernement, le salut du Président de la République et l'adieu silencieux de la foule. Nous avons évoqué dans notre mémoire le jour semblable d'octobre 1895 où furent célébrées les funérailles nationales

de Pasteur. Nous avons éprouvé une fois de plus que cette effusion d'amour et de reconnaissance d'un peuple entier, serré autour d'un de ses enfants, dans cette île de la Cité qui est le berceau de Paris et le cœur de la nation, est la plus belle forme de la gloire, et nous avons senti l'admirable continuité et la pérennité de l'Institut Pasteur.

Ce n'est pas le moment d'exposer en détail la vie et l'œuvre d'Émile Roux. Pour le faire, il faudrait savoir parler de lui comme il a parlé de ses prédécesseurs et de ses compagnons de travail. Mais rien qu'à en retracer les grandes lignes on retrouve, dans une œuvre personnelle admirable, la présence du Génie qui anime toujours notre maison.

Émile Roux est né à Confolens le 17 décembre 1853. Il a reçu sa première éducation de sa mère et de sa sœur aînée; il a été au collège d'Aurillac, puis au lycée du Puy, dont son beau-frère, M. Momont, était le censeur. Doué d'une grande facilité pour les exercices des classes, il pouvait gagner beaucoup de temps et se nourrir d'excellentes lectures. Lorsqu'il commença ses études médicales à l'École de médecine de Clermont-Ferrand, un camarade le présenta à un jeune professeur de chimie de la Faculté des Sciences, qui l'employa comme préparateur, Émile Duclaux. Venu à Paris pour la continuation de ses études, Roux entra comme aide de clinique à l'Hôtel-Dieu, dans le service de Béhier, où il fut chargé du petit laboratoire. Puis il fut reçu au Val-de-Grâce, qu'il quitta en 1877, avant d'avoir fait sa thèse. A ce moment, Duclaux, nommé professeur de météorologie à l'Institut agronomique et voulant donner des conférences à la Sorbonne sur la science nouvelle créée par Pasteur, redemanda au jeune Roux de l'aider à préparer ce cours. Un peu plus tard, lorsque Pasteur, sur le point de s'attaquer aux maladies microbiennes, chercha pour l'assister un jeune médecin, ce fut Duclaux qui lui signala Roux. Roux entra au laboratoire de Pasteur, alors à l'École normale, en novembre 1878; il ne le quitta plus.

Ainsi, avant d'être médecin, Roux a été chimiste. L'éveil à la science, le choc qui détermine la vocation, il les a reçus de

l'âme généreuse de Duclaux, qui, jeune lui-même, cherchait à enflammer les jeunes, pour former à la nation une élite. Nous ne devons pas oublier que c'est Duclaux qui a donné Roux à Pasteur.

Tandis que le disciple, âgé seulement de vingt-cinq ans et « brûlant du feu sacré », est entraîné par le maître génial sur la voie qui conduit à l'atténuation des virus, à la vaccination anticharbonneuse et à la prophylaxie de la rage, cimes vertigineuses de l'épopée pasteurienne, dans l'esprit du jeune clinicien conquis à l'étude des microbes veille une pensée de chimiste : l'immunisation par des substances solubles. Cette pensée remplit le mémoire qu'il écrit en 1888, avec Chamberland, sur l'immunité conférée contre la septicémie aiguë, mémoire qui contient en germe les plus importants travaux de Roux, et qui est dans son œuvre une source, à peu près comme le fameux mémoire sur la fermentation lactique dans l'œuvre colossale de Pasteur.

Roux développe l'expérience pasteurienne de la filtration de la culture du choléra des poules. Il cherche les produits microbiens susceptibles de reproduire la maladie sans la présence des microbes. Il prévoit les conditions de la production des toxines : le microbe, dit-il, peut former dans un milieu donné des substances solubles qu'il ne formerait pas dans d'autres ; c'est à l'analyse chimique, guidée par l'expérimentation physiologique, à isoler ces corps. Il se demande si cette immunité « conférée d'emblée et dans un temps si court » est comparable à celle que procure l'inoculation des virus atténués, les matières que l'on introduit dans le corps pour produire l'état réfractaire étant éliminées ou modifiées si vite que l'immunité qu'elles produisent est éphémère. Séduit par la théorie phagocytaire, il ajoute que l'immunisation par des substances chimiques ne diminue en rien l'importance du rôle des phagocytes, mais la fait mieux comprendre, l'action des phagocytes paraissant liée à des changements chimiques survenus dans le corps et qui constituent l'état réfractaire.

Il est dès lors fatal que le jour où il s'emparera de la diphtérie (élève au Val-de-Grâce, quand il ne savait pas qu'il entrerait un jour au laboratoire de Pasteur, la diphtérie était

le sujet de thèse qu'une prescience lui avait inspiré et qu'il avait délaissé — provisoirement — pour la rage), il découvre cette substance soluble, la toxine, et se demande dès son premier mémoire sur la question : « Est-il possible d'accoutumer les animaux au poison et de produire chez eux par ce moyen l'immunité contre la diphtérie? »

Telle est l'origine de la découverte de la toxine diphtérique, par Roux et Yersin; puis du pouvoir antitoxique des sérums, par Behring et Kitasato; puis de la sérothérapie antidiphtérique, par Roux et Martin et de l'application aux enfants, par Roux, Martin et Chaillou, qui firent une entrée retentissante dans le monde par la communication au Congrès de Budapest, en 1894. Déjà, avant la sérothérapie antidiphtérique, Roux avait tenté la sérothérapie antitétanique avec Vaillard; plus tard est venue la sérothérapie antivenimeuse (Calmette; Phisalix et Bertrand). Ensuite, à distance, l'essai de sérothérapie anticholérique, avec Metchnikoff et Salimbeni. Il est légitime de compter dans la même lignée l'étude des propriétés adhésives des toxines, et, en collaboration avec Borrel, le mémoire sur le tétanos cérébral et l'immunité contre le tétanos, de 1898.

L'impulsion donnée par Roux à l'étude expérimentale des toxines a été si puissante que cette recherche est toujours restée dans la tradition scientifique de l'Institut Pasteur, et a conduit plus tard, avec Ramon, à la découverte des anatoxines, qui a comblé de joie l'auteur de la découverte des toxines.

Sur la filtration comme sur le rôle des produits bactériens solubles, Roux continue avec sa forte originalité la pensée pasteurienne. La pratique de la filtration des cultures devait venir des chimistes. Pasteur avait filtré les microbes de l'air sur des bourres de coton. Joubert et Chamberland avaient imaginé les bougies de porcelaine. La comparaison de ce qui passe et de ce qui ne passe pas sur les filtres imposa la notion des microbes filtrables. Roux et Nocard, avec la collaboration de Borrel, Dujardin-Beaumetz et Salimbeni, montrent qu'il y en a de visibles et d'invisibles. Par la technique des sacs de collodion, par un emploi rigoureux des témoins, par la culture (jusque-là réputée impossible) en série, suivie de réinocula-

tions, du microbe de la péripneumonie des bovidés, ils posent une des pierres angulaires de la science des virus filtrables, qui, depuis, a envahi une si grande partie de la microbiologie.

Le nom de Roux est inséparable des découvertes sur la rage. Avec Pasteur, il a exécuté ce tour de force de vacciner contre un microbe, inconnu alors, encore inconnu aujourd'hui, et dont la figure reste cachée dans la nature, comme celle d'autres inframicrobes.

Nombreux sont les travaux de Roux sur le charbon, sur la rage, sur la diphtérie et le tétanos, sur le choléra, qu'il faudrait encore citer. Ayant reçu de l'Institut de France le prix Osiris, il le consacre aux recherches qu'il poursuit avec Metchnikoff sur la syphilis expérimentale, origine des victoires que la microbiologie et encore la chimie ont remportées depuis bientôt trente ans sur la syphilis.

Pour mesurer justement l'œuvre de Roux, il faudrait se livrer à un inventaire minutieux des travaux accomplis à l'Institut Pasteur pendant quarante ans. On a dit avec raison qu'on retrouve dans beaucoup d'entre eux sa présence ou sa trace, comme inspirateur, comme guide, ou, si l'on peut dire, par les suggestions de son esprit critique, précis et infaillible, comme ajusteur.

La pensée scientifique a besoin d'être servie par des organes. A côté de Pasteur, Chamberland et Roux créaient pas à pas la technique microbiologique. On dit couramment, dans les laboratoires, le tube de Roux, la boîte de Roux, le régulateur de Roux. La culture des anaérobies lui doit beaucoup. Il a, avec Nocard, rendu possible l'obtention rapide des cultures du bacille de la tuberculose par l'introduction de la glycérine. Les moyens optiques, auxquels il attache une grande attention dans les expériences sur la péripneumonie, il s'en était occupé dès ses débuts : Pasteur écrit en 1885, dans une lettre à Ferran, que « Roux a perfectionné la photographie microscopique, au point que ses photographies sont d'une grande netteté, même au grossissement de plus de 1.500 diamètres ».

Roux a été un grand hygiéniste parce qu'il a été un grand pasteurien, car les deux aspects de la prophylaxie des maladies

infectieuses, le microbe et le terrain, la doctrine pasteurienne, qui a repris avec Raulin le problème de l'alimentation, les a révélés l'un et l'autre. Pendant trente-cinq ans, dans les nombreux Conseils d'hygiène de l'État, du département de la Seine et de la Ville de Paris, dans les congrès de techniciens, dans les campagnes philanthropiques, Roux s'est acquis une étendue d'expérience et une maîtrise irremplaçables. Il a été la lumière qui éclairait toutes les questions et l'apôtre qu'on s'est souvent repenti de n'avoir pas toujours suivi. Comme Duclaux, il n'a eu qu'à unir sa science, son expérience et son bon sens souverain, pour arriver d'emblée à la forme moderne de l'hygiène, l'hygiène sociale. Il a été l'animateur d'œuvres sociales nombreuses et variées, en tête desquelles il faut citer au moins l'Œuvre Grancher, la Protection des Tout-Petits, l'Institut prophylactique, le Comité de propagande d'hygiène sociale et d'éducation prophylactique. Son discours de 1920 à une assemblée générale de cette dernière société est resté — malheureusement, car les lacunes qu'il a signalées ne sont pas encore comblées — le programme de l'hygiène en France. Il a défini la tâche essentielle, qui consiste à éduquer les enfants par le fait et par l'habitude, bien plus que par des conférences ; il a eu des mots à l'emporte-pièce sur la bureaucratie qui défend un pays contre les maladies avec le porte-plume ; il a répété que le premier devoir de l'hygiéniste est l'action sur le terrain.

Au moment où nous avons la douleur de le perdre, il est surtout pour nous la personnification de l'Institut Pasteur.

Sa vie contient l'histoire de l'Institut Pasteur, comme l'Institut Pasteur a contenu toute sa vie.

L'Institut qu'il a reçu de Pasteur et de Duclaux, il le transmet à ses successeurs matériellement et moralement agrandi et assuré d'un essor illimité.

Il en a été, pour réaliser la pensée de Pasteur, l'architecte, le constructeur, l'organisateur ; le sous-directeur de 1895 à 1904, avec le deuxième directeur, Duclaux ; ensuite le directeur, pour un règne de trente ans. Jamais chef ne s'est identifié d'une manière aussi absolue avec l'institution dont il a eu la charge. Pendant les dix-sept dernières années, il a habité la maison. Dans cette haute, claire et simple cabine, dont tant d'amis et de

disciples ont gravi le raide escalier, il s'est installé dans sa solitude, comme le capitaine sur sa passerelle. Célibataire, sans ambitions extérieures, ni vacances, ni voyages : sa présence continuelle a été répandue dans toutes les parties de la maison comme la sensibilité et la chaleur dans toutes les parties du corps vivant. Il a donné l'exemple du don de soi absolu. Par la simplicité de sa vie, le dédain en toutes choses (même dans l'outillage scientifique) du luxe inutile, la passion exclusive pour la recherche et la découverte, le dévouement à sa tâche, il a réalisé le prototype du savant, et en particulier du Pasteurien, auquel il faut se tenir ou revenir si l'on veut accomplir de grandes choses. Son « ascétisme » s'est imposé à l'admiration et au respect, parce que c'était l'expression directe de sa nature, sans le mélange de la moindre parcelle d'ostentation. Il a donné l'exemple à tous sans faire la leçon à personne.

Parmi les époques de sa vie confondue avec celle de l'Institut, il y en a deux que nous nous rappelons avec plus de reconnaissance ou d'émotion :

Celle du début, où il a créé l'enseignement qui répandit la science et la technique bactériologiques, alors toutes jeunes et nouvelles, dans le monde entier, pour l'honneur de notre pays. On dit toujours « le cours de Roux » et « la technique de Roux ». Il en reste, pour quiconque prétend être bactériologiste, une obligation de se soumettre à un apprentissage régulier, de manipuler avec pureté et d'expérimenter avec rigueur, qui, par Roux, procède de Pasteur lui-même.

Il y a l'époque tragique de la guerre, où Roux mobilisa, volontairement et totalement, l'Institut Pasteur, fournit à l'État les millions de doses de sérums indispensables, équipa les laboratoires des armées françaises et de quelques armées alliées, prodigua le labeur intense de travailleurs aussi peu nombreux que possible (il ne chercha jamais à soustraire les jeunes à leur devoir de combattants), tout cela avec la volonté et le cœur d'un chef, qui ne s'éloignait que pour d'utiles visites au front et, sensible à l'extrême, frémissant aux nouvelles, gardait quand même une fermeté stoïque, soutenu lui-même et soutenant les autres par l'amour sacré de la Patrie.

Quel fut le ressort intime de cet homme, qui parlait si peu de lui-même ? D'où venait le feu intérieur dont la flamme allumait

dans ses yeux cette étincelle inoubliable? Quel est le secret de cette puissance, qui restait sur la réserve même quand elle se faisait familière et paternelle, et qui inspirait beaucoup de respect, un peu de crainte et une si profonde affection? Ceux qui l'ont le mieux connu disent : l'intelligence, si subtile, si prompte à signaler le point sensible des questions scientifiques et des problèmes de la vie pratique; ou : le sens exigeant et impérieux du devoir, tout d'abord de son devoir propre, à accomplir à chaque jour et à chaque heure; ou bien : la bonté, si avide d'agir que sa pudeur morale n'a pas réussi à la cacher, et dont on se raconte tout bas les traits réels, devenus légendaires? Sans doute ce fut tout cela à la fois, et c'est un honneur pour l'espèce humaine que ces qualités et ces vertus trop souvent séparées se soient unies chez cet homme supérieur.

Des images qui nous resteront de lui, les plus chères seront celles de son ardente jeunesse et, tout à la fin, la sévère beauté de son visage endormi pour toujours, où la mort a choisi, pour les fixer dans une expression définitive, l'intelligence et l'austérité.

La mort n'empêchera pas le D^r Roux d'être toujours présent à l'Institut Pasteur. Tandis que son œuvre sera continuée, il aura, nous l'espérons, sa sépulture dans l'ancienne partie de l'Institut, non loin de ce bureau de l'économet où il arrivait avec ponctualité chaque matin à 9 heures, retardé seulement par les collègues qui le cueillaient sur le chemin, et de ces allées de marronniers où il aimait à passer pendant l'été; non loin du tombeau de Pasteur; toujours identifié avec la Maison, dont cette double et éternelle présence symbolise l'indépendance, la continuité et la pérennité, donnant à nous-mêmes et à ceux du dehors qui nous observent avec sympathie la certitude que la vie de l'Institut Pasteur ne sera jamais ni interrompue, ni diminuée.

DISCOURS

du Ministre de la Santé publique aux funérailles de M. ROUX.

Sur cette même place, où viennent se rejoindre toutes les routes de France, il y a près de quarante années, un hommage solennel était rendu par la Nation à la dépouille mortelle du grand Pasteur.

A celui qui fut le premier de ses disciples et consacra sa vie au développement de son œuvre, était dû le même témoignage de la douleur et de la reconnaissance nationales.

Funeste destin qui, abattant Émile Roux après Calmette, ravit à la Maison du Maître ces deux nobles savants que la mort a réunis dans la gloire comme ils furent réunis dans leur génial et fécond labeur.

En apportant aujourd'hui au Dr Roux, qui nous l'a permis, le suprême salut du pays, le Gouvernement de la République est assuré de répondre au vœu profond de la conscience populaire.

Il suffit, pour s'en convaincre, d'évoquer l'incessant cortège de parents et d'enfants qui, jusqu'à ce matin, s'est déroulé à l'Institut Pasteur, devant ce cercueil, comme une expression émouvante de piété et de gratitude.

Cette triste ferveur anonyme des familles préservées par son génie, il la pressentait sans doute, le savant solitaire, au cours de ses patientes recherches, comme sa meilleure récompense. Il devait alors, par un mouvement naturel, se reporter à son enfance tôt privée du soutien paternel, à cette atmosphère d'université dans laquelle il avait austèrement grandi, du collège de Confolens aux lycées d'Aurillac et du Puy, et dans laquelle il avait puisé son goût du travail intellectuel comme son amour passionné de la connaissance.

L'étudiant de l'École de Médecine de Clermont-Ferrand qui rencontra le jeune agrégé Duclaux, son premier maître; le préparateur qui accepta, pour assurer une difficile existence

matérielle, le poste d'aide de clinique à l'Hôtel-Dieu de Paris, a déjà choisi entre deux routes, celle de la profession médicale et celle plus rude qui le conduira aux recherches ardues des laboratoires.

Sans doute brillait-elle déjà dans son regard, cette flamme ardente qui ne devait s'éteindre qu'avec lui, lorsque Pasteur, par un hasard heureux, découvrit le jeune préparateur, et, présentant en lui un des siens, l'adopta pour ne plus s'en séparer. Parmi tous ses contemporains de la jeunesse des écoles, pénétrés d'un impérieux besoin de preuves, doutant du fondement des théories médicales, décidés à demander aux laboratoires le secret des progrès de la thérapeutique, Pasteur choisit ce modeste étudiant, peu soucieux des titres, silencieux et solitaire, tout brûlé d'une fièvre ardente de savoir.

Dès lors, Roux est mêlé de plus en plus à l'épopée pasteurienne qui se déroule aux regards du monde savant surpris et déconcerté. Son nom est attaché à toutes ses étapes, et il se donne entier, de toute sa jeunesse, à la véritable révolution scientifique qui s'annonce. Les théories les mieux accréditées sont controuvées, les dogmes sont ébranlés et il semble que tout un édifice soit sur le point de s'effondrer. Des résultats retentissants apparaissent : c'est l'étude du charbon et celle de l'atténuation des virus qui commence ; la merveille de la vaccination jennérienne contre la variole est reproduite à volonté ; une méthode est née qui entraînera des applications infinies !

Dans cet effort tenace pour vaincre le silence obstiné de la Nature, dans cette lutte contre les préjugés et parfois, hélas, les calomnies ou les résistances intéressées, dans ces pénibles outrages au génie de Pasteur, au sujet de la prévention de la rage, Roux garde son impassibilité inaltérable, réconfortant son Maître par sa foi.

Avec la même sérénité, il apportera plus tard à Calmette, injustement attaqué, le soutien de son autorité et de sa certitude.

Quand l'œuvre de Pasteur grandit et s'affirme, en 1887, par la construction de l'Institut, Roux y assume la direction de la microbie technique et organise le premier enseignement théorique et pratique de la microbiologie qui ait été donné au monde, démontrant par son exemple la force que peuvent

donner à l'homme de science le travail associé de la recherche et de l'enseignement.

Enfin, ce sont ces longues investigations, soumises à la méthode la plus sévère, qui l'amènent à la découverte des toxines et l'élèvent ainsi à l'un des grands sommets de la science bactériologique.

Si Behring et Kitasato, utilisant les découvertes de l'école française, obtiennent les premiers un sérum antitoxique, c'est à Roux et à ses élèves que l'on doit l'introduction dans la pratique de la thérapeutique par les sérums.

L'histoire de la médecine retiendra comme une date mémorable cette séance du Congrès de Budapest, en 1894, dans laquelle Roux présente une communication volontairement modeste, mais si précise et pertinente, qu'elle fit unanimement accepter aussitôt au monde entier la sérothérapie antidiphtérique. Elle annonçait que, désormais, pouvait être obtenu, en quantité illimitée, l'antidote spécifique, le sérum auquel, dans un élan spontané, la sentiment universel donna aussitôt son nom.

D'année en année, grâce au perfectionnement des techniques, va grandir le nombre des enfants arrachés à l'horrible agonie dans laquelle l'empoisonnement le dispute en horreur à l'asphyxie.

C'est par centaines de mille que se pourrait évaluer le nombre des existences humaines sauvées par le génie et la patience de ce grand Français.

Le croup, monstre hideux, épervier des ténèbres

comme l'a nommé Hugo, a cessé de faire trembler les mères. Si la diphtérie n'est pas définitivement vaincue en raison des difficultés du diagnostic, on aperçoit déjà le jour où cette terrible menace sera à jamais écartée des berceaux.

Glorieux épisode de la bataille jamais interrompue que livrent les meilleurs des hommes contre les ennemis de l'humanité et qui peut ouvrir, plus que les luttes guerrières, de si larges champs à ce besoin d'action qui est la loi même de la vie.

Roux poursuit son effort inlassable dans cet Institut dont il est devenu le Directeur.

La guerre l'y trouve et c'est là que, dans une cellule monacale, il passera désormais toute sa vie ; il y dirige cet immense effort qui va fournir aux armées des quantités considérables de vaccins et de sérums ; leur emploi généralisé réduira presque à néant la mortalité due aux épidémies, et, grâce au sérum antitétanique, aux infections consécutives aux blessures du feu.

La paix revenue, l'effort pasteurien ne se ralentit pas ; il anime dans le monde entier des œuvres de son esprit ; l'Institut grandit : des laboratoires nouveaux se créent, notamment celui des vaccins ; des services naissent, comme celui de la tuberculose ; son activité s'étend dans tous les domaines et jusqu'aux redoutables maladies exotiques.

Par son inlassable activité, son impeccable érudition, son intelligence accueillante, son jugement précis, sa rayonnante bonté, Roux encourage, réconforte, arbitre, dirige sans repos, sans profits. Peut-on le dire, ici, devant cette tombe, de toutes ces découvertes dont il aurait pu tirer tant d'avantages, il ne veut rien. Tout est pour l'Institut. Il ne veut rien de tout ce que le monde offre de ses mains tendues à celui qui le guérit et le préserve. Rien que son cache-nez, sa longue houppe, son lit de fer, sa chambre blanche.

Dans un temps où se fait si âpre la poursuite des avantages individuels, quel bienfaisant réconfort nous offre ce désintéressement si total qu'il voulait s'ignorer lui-même !

Au terme de cette évocation, devant notre pays tout entier, de la vie de cet homme qui faisait honneur à l'Homme, nous en voyons mieux apparaître l'harmonie et la pureté. Cette admirable figure, les Français d'aujourd'hui, qui doutent ou laissent douter d'eux-mêmes, peuvent la regarder sous toutes les lumières, comme le témoignage de ce que peuvent donner à l'Humanité leur culture et leur sol.

Une émotion commune et un infini respect nous inclinent tous devant cette noble existence qui vient de se terminer dans la paix.

Une pure lumière s'est éteinte qui, même indistincte au passant, donnait de la clarté au ciel de France ; puisse notre pays, si cruellement appauvri par ce nouveau coup, trouver une leçon et une force nouvelle dans l'exemple d'une telle vie !

ALLOCUTION

de M. L. VAILLARD, à l'Académie de Médecine,
séance du 7 novembre 1933.

Le malheur frappe à coups redoublés sur la Maison de Pasteur.

Hier, Calmette était terrassé, atteint debout, face au travail. Aujourd'hui, Roux, dont les forces s'épuisaient à la tâche quotidienne, s'assoupit et s'endort pour toujours, trouvant enfin le repos qu'il se refusait à lui-même. J'ai recueilli son dernier souffle et vu s'éteindre la flamme qui brillait en ses yeux. Pardonnez à l'amitié de dire ici sa douleur, d'apporter un pieux et modeste hommage au savant illustre, au grand Français dont le nom vivra dans la reconnaissance des peuples.

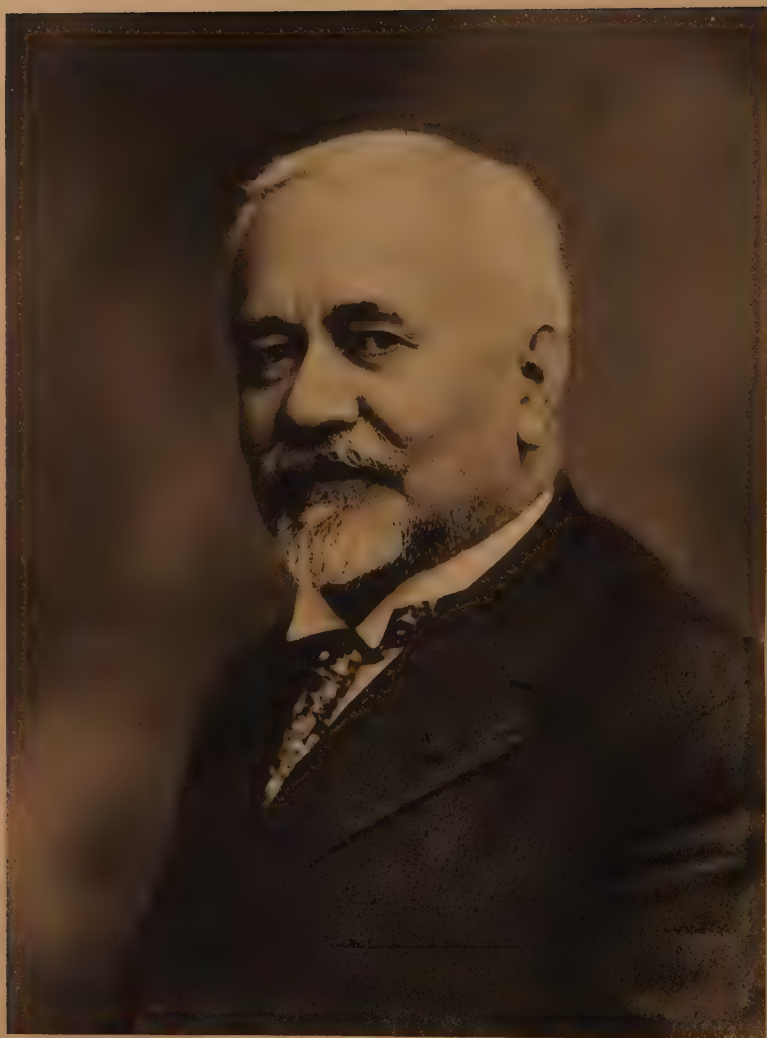
Roux, le disciple, le collaborateur, le fils spirituel de Pasteur ! son continuateur dans cette Académie qu'il honorait, nous donnant, lorsqu'il y prenait la parole, l'illusion du Maître invisible et toujours présent. Il fut un grand serviteur du pays, un bienfaiteur de l'humanité dont la vie scientifique et publique sera un exemple pour les générations qui montent. Jamais âme plus noble et plus haute n'habita un corps plus fragile, mince enveloppe que la passion de la science et du bien public rongeaient lentement. Roux se dévouait sans compter à toutes les tâches, même les plus humbles, même les plus pénibles quand il s'agissait du bien public, de fléaux à maîtriser ou à prévenir. L'intérêt général était le seul mobile de ses actes, l'unique souci de ses aspirations. Sa bonté agissante était inépuisable, toujours silencieuse ou ignorée. Tel était l'homme.

Que dire du savant ! Son œuvre, glorieux patrimoine de la science française, appartient déjà à l'histoire de la Médecine universelle. Depuis sa collaboration avec Pasteur, chacun de ses travaux marque un progrès pour la médecine et un bienfait pour les peuples.

L'Institut Pasteur était l'œuvre de prédilection vouée, selon la volonté du Maître, à la science bienfaitrice de l'humanité. Il

l'avait conçu, bâti, animé de son esprit, et fait vivre jusqu'au delà des mers d'une vie intense et rayonnante dont la France doit avoir la fierté. Jusqu'à son dernier jour, il en resta l'âme, la conscience vénérée et aimée de tous, comme le bon génie tutélaire dont la modestie et la simplicité rehaussaient le prestige. Sa dernière pensée est allée aux travailleurs qu'il avait groupés dans cet asile de la libre recherche. Quand l'ombre de la mort commençait à s'étendre sur sa figure ascétique et à voiler la lumière qui illuminait son regard, on l'entendait murmurer à des interlocuteurs imaginaires : « Travaille-t-on dans les laboratoires ? il faut travailler. » Ce fut sa dernière exhortation et comme son testament.

Que Pasteur protège désormais cette Maison où le disciple viendra dormir le dernier sommeil auprès de son Maître, tous deux unis dans la mort comme ils avaient été unis durant la vie par le culte de la science, du devoir et de la patrie.



Hélio Illustration.

Phot. Pierre Petit, 1929.

ALBERT CALMETTE

1863-1933

Albert Calmette

ALBERT CALMETTE

1863-1933

Rien dans l'activité d'Albert Calmette ne trahissait le poids des ans. Auprès de son maître vénéré, M. Roux, il restait un grand animateur, attentif et bienveillant, de notre Maison, et continuait à la servir de toutes ses forces, de toute son âme et de tout son cœur. Une heureuse destinée semblait devoir nous le garder, l'esprit toujours alerte, jusqu'à l'achèvement de sa tâche et à l'épanouissement de son œuvre. Nous le désirions ardemment, parce que nous l'aimions tous d'une fraternelle ou filiale affection. Quelques heures ont suffi pour briser nos espoirs.

Ce que l'Institut Pasteur et la science perdent dans la personne d'Albert Calmette, nul n'oserait aujourd'hui le mesurer, tant le domaine est immense où ses magnifiques facultés se sont librement déployées.

Il était entré en 1883 dans le Service de Santé de la Marine nationale. Après sept années de campagnes lointaines, il demanda et obtint l'autorisation de travailler à l'Institut Pasteur qui venait d'être fondé. Lors d'un stage d'études qu'il accomplissait dans le laboratoire de M. Roux, il fut désigné par Pasteur pour fonder et diriger un centre vaccinogène et un laboratoire de recherches à Saïgon. Ce laboratoire de Saïgon devait être la première filiale de l'Institut Pasteur.

En janvier 1891, il est, comme il l'écrivait lui-même, à pied-d'œuvre, organise la production du vaccin jennérien et du

vaccin pasteurien contre la rage, et la prophylaxie des maladies épidémiques qui décimaient l'Indochine : le choléra et les dysenteries. Formé à l'École de Pasteur, il étudie la fermentation de l'opium et la fermentation alcoolique du riz, et il découvre, dans la poudre que les indigènes employaient pour obtenir des alcools de riz parfumés, une Mucédinée, l'*Amylomyces rouxii*, qui transforme l'amidon en sucre fermentescible en produisant une amylase très active.

C'est pendant son séjour à Saïgon qu'il entreprit ses premières recherches sur la physiologie des venins. Il les poursuivit dès son retour à Paris ; elles devaient préciser le mécanisme de l'envenimation et de l'immunité antitoxique et aboutir à la préparation d'un sérum thérapeutique. C'est encore à l'Institut Pasteur de Paris qu'il mit au point, avec A. Borrel et Yersin, la préparation d'un sérum antipesteux.

Pasteur et Roux confièrent alors à Albert Calmette la mission d'organiser à Lille un Institut de sérothérapie et de recherches microbiologiques, en vue de dispenser aux populations du Nord les bienfaits des vaccinations jennérienne et antirabique et ceux de la sérothérapie antidiphthérique. Il fut nommé Professeur d'Hygiène et de Bactériologie à la Faculté de médecine de Lille en 1898.

À l'Institut Pasteur de Lille, il reprend avec C. Guérin l'étude expérimentale de la vaccine, qu'il avait commencée à Saïgon en préconisant l'emploi de jeunes bufflons pour la préparation de la pulpe vaccinale. Il montre que l'inoculation du virus jennérien au lapin permet d'obtenir des vaccins presque purs et de titrer leur activité. Il met aussi en évidence ce fait, d'une importance pathogénique capitale, que le virus de la vaccine, inoculé au lapin par voie veineuse, circule quelques heures dans le sang et que, pendant ce délai, il peut se fixer dans une région fraîchement rasée de la peau, s'y développer et provoquer l'apparition de pustules caractéristiques.

Assisté de Deléarde et de Massol, il étudie les propriétés antigènes de l'abrine, la nature des venins et leurs effets sur l'organisme. Ses travaux sur les réactions entre ces substances et leurs anticorps spécifiques sont d'une précision et d'une perfection telles que, quinze années plus tard, ils devaient servir de modèle et de guide à G. Ramon pour la découverte des

méthodes de titrage *in vitro* des toxines et des antitoxines.

Il s'attaque avec E. Rolants, E. Boullanger, Constant et Massol au problème de l'épuration biologique des eaux usées, urbaines et industrielles, et crée une station expérimentale à La Madeleine, aux environs de Lille. Avec M. Breton, il poursuit une large enquête sur l'épidémie d'ankylostomiase qui sévissait dans les populations minières du Nord et donne les règles d'une prophylaxie efficace de cette grave affection parasitaire. Entre temps (1899), Calmette dirige, avec Salimbeni, une mission chargée de combattre une épidémie de peste à Porto; il précise la technique du traitement de la peste par l'injection intraveineuse de doses massives de sérum anti-pesteux.

En 1910, il crée et organise, avec Edmond Sergent, l'Institut Pasteur d'Algérie.

De tous les sujets auxquels il se consacra avec une incomparable activité et un talent éclairé par une merveilleuse intuition, aucun ne lui tint plus à cœur que le problème de la prophylaxie antituberculeuse.

Préoccupé de dépister la maladie dès son début, pour en restreindre les ravages, il cherche tout d'abord à former l'éducation hygiénique des populations ouvrières de la région lilloise et à assister les tuberculeux qui ne pouvaient être admis dans les sanatoriums de cure. En 1901, il fonde à Lille, sous le nom de Dispensaire Emile Roux, le modèle de ces établissements que les organisations sanitaires du monde entier devaient rapidement imiter.

Mais pour que la lutte contre le fléau fût efficace, il était nécessaire, avant tout, de connaître exactement les modes de la contagion. Contrairement à l'opinion régnante, et se fondant sur les expériences de Nocard sur l'infection morveuse, Albert Calmette adopte, élargit une hypothèse émise par Chauveau et pose en principe que le bacille de Koch pénètre dans l'organisme non par les voies respiratoires, mais par les voies digestives. Avec la collaboration de C. Guérin, il institue toute une série de recherches qui furent poursuivies pendant plusieurs années et qui fournirent la preuve, d'une part que la tuberculose, même lorsqu'elle se localise en apparence aux pou-

mons, relève dans un grand nombre de cas d'une infection *per os*; d'autre part, que la culture *in vivo* des bacilles s'opère dans le système lymphatique.

En dehors de ses études avec L. Massol, M. Breton et R. Letulle sur les antigènes et les anticorps tuberculeux, avec C. Guérin sur le rôle des surinfections rapprochées dans la genèse de la phthisie, avec V. Grysez sur l'infection par voie conjonctivale, nous devons encore à Albert Calmette cette notion immunologique fondamentale que les animaux de l'espèce bovine, lorsqu'ils sont soumis à une seule infection par le bacille de Koch, puis maintenus à l'abri de toute contamination, contractent une tuberculose bénigne qui leur permet de résister aux épreuves virulentes expérimentales et naturelles. Les bacilles pathogènes que l'on inocule aux animaux porteurs de lésions latentes ou occultes ainsi produites sont éliminés par les voies biliaires et par l'intestin, sans provoquer d'autres troubles qu'une réaction allergique fugace.

Cette découverte devait orienter Albert Calmette vers la recherche d'un procédé destiné à rendre le bacille de Koch inoffensif pour l'homme et pour les animaux réceptifs, tout en lui conservant intégralement ses propriétés antigènes et vaccinales. En cultivant en série, pendant un très grand nombre de passages, sur la pomme de terre cuite dans de la bile glycéринée, un bacille bovin très virulent à l'origine, Calmette et Guérin réussirent à le transformer en une race atténuée et fixée dans ses caractères biologiques. L'innocuité de ce bacille bilité, universellement connu sous le nom de BCG, est depuis longtemps hors de doute, et son efficacité préventive dans la prophylaxie de la tuberculose ressort aussi nettement des expériences sur les animaux que de l'application à la vaccination des jeunes enfants et des bovidés. On sait que, depuis les premiers essais effectués sur des nourrissons en 1921 par Weil-Hallé, la méthode de prémunition au moyen du BCG est employée dans un grand nombre de pays et qu'elle a pour heureux effet de réduire la mortalité du jeune âge dans des proportions considérables. Des centaines de milliers d'enfants, exposés à une contamination certaine, lui doivent la santé ou la vie.

La guerre avait presque entièrement interrompu l'œuvre

d'Albert Calmette. Resté à son poste à Lille pendant toute la durée de l'occupation allemande, il continua néanmoins à servir sa patrie en soulageant les misères de ses compagnons d'infortune, et la science en rédigeant son magistral traité : *l'Infection bacillaire et la Tuberculose*, édité en 1920.

En 1923, pendant qu'il perfectionnait la technique de préparation du BCG, sa pensée toujours en éveil se dirigea vers l'étude biologique du bacille de Koch. Avec J. Valtis, il répète les expériences déjà anciennes de Fontès, confirme l'existence d'éléments filtrables à travers les bougies de porcelaine, montre que ces éléments, qu'il dénomma « ultravirus tuberculeux », peuvent traverser le placenta et passer de la mère au fœtus, et précise le rôle qu'ils sont susceptibles de jouer dans certaines formes de l'infection bacillaire.

Au cours de ces derniers mois, faisant retour à un des sujets qu'il avait traités au début de sa carrière, il essaya avec A. Saenz et L. Costil d'appliquer le venin de cobra au traitement du cancer de la souris.

Albert Calmette fut nommé sous-directeur de l'Institut Pasteur de Paris après la mort de Metchnikoff, en 1917. Mais, à Paris, où il prit ses fonctions en 1919, quelques mois après la libération de Lille, il ne put disposer que de locaux insuffisants. Sur la proposition de M. Roux, le Conseil d'Administration et l'Assemblée de l'Institut Pasteur lui donnèrent satisfaction en 1929, en décidant d'édifier un vaste bâtiment qui devait contenir tous les services de la tuberculose. Calmette en établit lui-même les plans et en surveilla l'aménagement. En juin 1931, lorsqu'il s'installa rue Falguière, il rayonnait de bonheur en songeant aux recherches qu'il allait pouvoir entreprendre avec ses fidèles disciples C. Guérin, A. Boquet et L. Nègre, devenus ses chefs de service, et de nombreux collaborateurs.

Le destin lui fut encore clément pendant deux années. Dans ce foyer qu'il animait de sa flamme et de sa bonté, il déploya une incroyable activité. Sans égards pour sa santé, il dépensait toutes ses forces à la diffusion du vaccin BCG, à la conduite des recherches expérimentales, aux devoirs de ses fonctions de sous-directeur, à l'organisation et au développement de nouvelles filiales de l'Institut Pasteur, aux séances des Académies,

des Conseils d'hygiène et du Comité national de Défense contre la Tuberculose, aux œuvres d'assistance et de prophylaxie, et sa tâche, écrasante pour tout autre, se terminait toujours fort avant dans la nuit.

On eût dit que le pressentiment obscur d'une fin prochaine l'entraînait à brûler les étapes, et que la crainte de ne pouvoir assez se donner à son œuvre le dévorait. Personne ne réussit jamais à le détourner un instant de son chemin. Nul conseil, si pressant et si affectueux fût-il, n'eut raison de son indomptable volonté.

« J'espère qu'il me sera donné de travailler jusqu'à ce que mes yeux se ferment à la lumière, et que je m'endormirai l'âme en paix, avec la conscience d'avoir fait ce que j'ai pu. » Ces vœux, qu'il formulait il y a quelques mois à peine, ont été exaucés. Mais il nous manque cruellement, et sa mort prive la science d'un de ses plus illustres serviteurs.

L'Institut Pasteur tout entier s'associe au deuil de M^{me} Calmette et de ses enfants, et notre grande famille se groupe autour d'eux pour déplorer la perte de celui qui sut éveiller dans nos cœurs l'admiration la plus fervente, le respect le plus dévoué et la plus confiante affection.

IMMUNISATION DU LAPIN PAR DES ÉCHANTILLONS D'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE DE VALEUR ANTIGÈNE DIFFÉRENTE

MARCHE DE L'IMMUNISATION.
APPRÉCIATION DU POUVOIR IMMUNISANT DE L'ANATOXINE
PAR LA MÉTHODE DE FLOCCULATION,
DOSAGE DE L'ANTITOXINE,
ÉPREUVE INTRACUTANÉE DIRECTE

par YOSHIKATA ASAKAVA.

(*Institut Pasteur. Annexe de Garches.*)

L'anatoxine diphtérique est devenue d'un usage courant pour la prévention de la diphtérie dans presque tous les pays. Nous avons nous-même montré, dans des essais effectués au Japon, la grande valeur de cette méthode de prophylaxie (1).

Mais, outre que l'anatoxine de Ramon nous fournit un excellent moyen pratique pour lutter contre la diphtérie, elle rend possible un grand nombre de recherches en nous donnant toutes facilités pour immuniser les animaux de laboratoire. Mettant à profit ces facilités, nous nous sommes proposé :

1° D'étudier chez le lapin la marche de l'immunisation par l'anatoxine. Nous avons en effet remarqué, lors de nos essais de vaccination antidiphtérique, et de leur contrôle par l'épreuve de Schick, que cette épreuve ne devenait négative qu'assez tardivement chez certains de nos sujets vaccinés. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier expérimentalement cette question en nous servant pour le contrôle de l'immunité chez nos lapins, d'une part de l'épreuve toxique intracutanée, d'autre part du dosage de l'antitoxine spécifique dans le sérum de ces mêmes lapins à l'aide de la méthode d'Ehrlich adaptée par G. Ramon à ce genre de dosage.

2° De comparer entre eux les différents procédés d'appré-

1. YOSHIKATA ASAKAVA. *Kitasato Archives of experimental medicine*, 8, n° 3, juillet 1931.

ciation du pouvoir immunisant de l'anatoxine : mesure de la valeur antigène intrinsèque par la floculation, titrage de l'antitoxine dans le sérum des lapins vaccinés au moyen de différents échantillons d'anatoxine, estimation de l'immunité par l'injection intracutanée dans le derme des lapins, de dilutions variables de toxine.

TECHNIQUE.

L'immunisation des lapins a été réalisée à l'aide de deux injections sous-cutanées d'anatoxine diphtérique : la première de 1 cent. cube, la seconde de 2 cent. cubes, faites à trois semaines d'intervalle.

Divers échantillons d'anatoxine ont été utilisés dont la valeur antigène déterminée par la floculation est comprise entre 7 et 30 unités. Chaque échantillon a été, en général, administré à un groupe de 3 lapins.

Nous avons suivi l'immunisation de chacun de nos lapins en les soumettant périodiquement à l'épreuve intracutanée au moyen de dilutions de toxine diphtérique. En vue de cette épreuve, le dos des lapins est préalablement épilé à l'aide de sulfure de baryum. Le lendemain de cette opération, 0 c. c. 2 de diverses dilutions de la toxine d'épreuve sont injectés dans le derme en différents endroits suffisamment espacés. Les résultats de l'épreuve sont observés chaque jour; seuls ceux notés le troisième ou quatrième jour ont été enregistrés dans les tableaux figurant dans ce mémoire. Dans ces tableaux, la notation $1/500\ 000$, $1/200.000$, par exemple, correspond à l'injection intradermique de 0 c. c. 2 de dilution au $1/100.000$, au $1/40.000$ etc. La toxine étalon employée dans nos expériences produit encore une réaction positive chez le lapin neuf à la dose de 0 c. c. 2 d'une dilution au $1/1.000.000$. Cette dernière dose a été prise comme unité — *unité intradermique* — pour comparer la valeur des réactions intracutanées dans les tableaux qui figurent à la fin de cet exposé.

Nous avons aussi apprécié l'immunité dans chaque groupe de lapins en dosant l'antitoxine dans le mélange des sérums des animaux du groupe. Dans ce but, une première prise de sang est effectuée immédiatement avant la seconde injection, puis d'autres saignées sont faites à intervalle de temps plus ou

moins réguliers. Ces saignées, d'environ 10 cent. cubes de sang, sont pratiquées à la veine de l'oreille. Le lendemain de la saignée, le sérum est prélevé et les sérums des lapins appartenant au même groupe, et traités par le même échantillon d'anatoxine, sont mélangés. Le sérum « moyen » de chaque groupe est alors soumis au dosage de l'antitoxine spécifique. Suivant la technique de G. Ramon, des quantités variables du sérum à doser sont additionnées de fractions de L + : $1/30$ L +, $1/10$ L +, $1/5$ L + (1), etc., les mélanges ainsi constitués sont éprouvés chez des cobayes du poids de 250 grammes. Les résultats sont appréciés d'après les règles de la méthode d'Ehrlich et chiffrés en fraction d'unité antitoxique.

Voici un exemple qui montre, d'une part, les proportions de toxine et de sérum entrant dans la composition de nos mélanges et, d'autre part, la fraction d'unité antitoxique correspondant à ces mélanges.

Toxine étalon.	$1/10$ L +	$1/10$ L +	$1/20$ L +	$1/30$ L +
Sérum, en centimètre cube. . . .	$1/2$	1	1	1
Fraction d'unité antitoxique correspondante	$1/5$	$1/10$	$1/20$	$1/30$

Ajoutons que la toxine étalon utilisée était la même pour l'épreuve intradermique directe et pour le dosage de l'antitoxine, ce qui rend encore plus comparables les résultats obtenus.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES.

Un lot de 9 lapins est divisé en 3 groupes de chacun 3 animaux. Chaque groupe est vacciné au moyen d'un échantillon d'anatoxine différent :

N° I (7 unités).

N° II (12,5 unités).

N° III (20 unités).

Trois semaines après la première injection (1 cent. cube) et immédiatement avant la deuxième (2 cent. cubes) on saigne les lapins; le mélange des sérums de chaque groupe est titré comme

(1) Il est indispensable que la dose de toxine correspondant au $1/30$ de L + représente au moins deux doses mortelles pour un cobaye de 250 grammes.

nous l'avons dit. Le pouvoir antitoxique est, pour les trois sérums de mélange, inférieur à 1/60 d'unité.

L'épreuve intracutanée pratiquée en même temps que la prise de sang a fourni les résultats suivants :

NUMÉRO de l'anatoxine	NUMÉRO des lapins	1/500.000	1/200.000	1/100.000	1/50.000
I (7 unités)	1	—	—	—	+
	2	+	+	++	++
	3	—	++	++	++
II (12,5 unités) . . .	4	—	+	+	++
	5	—	+	+	++
	6	—	—	+	+
III (20 unités)	7	—	—	+	+
	8	—	—	+	+
	9	+	++	++	++

Le neuvième jour après la deuxième injection d'anatoxine, seconde saignée et dosage de l'antitoxine dans les sérums provenant des mélanges des sérums de chacun des 3 groupes.

Voici rapportée, à titre d'exemple, l'expérience concernant ce dosage.

MÉLANGE des sérums des lapins vaccinés avec l'anatoxine	DILUTIONS DE SÉRUM et doses d'antitoxine	RÉSULTATS de l'épreuve chez le cobaye	TITRE antitoxique
I (7 unités)	1/3 cent. cube sérum	+ 1/10 L +.	+ 1/10-1/3 u.
	1 cent. cube sérum	+ 1/10 L +.	
	1 cent. cube sérum	+ 1/20 L +.	
II (12,5 unités) . . .	1/3 cent. cube sérum	+ 1/10 L +.	1/10
	1 cent. cube sérum	+ 1/10 L +.	
	1 cent. cube sérum	+ 1/20 L +.	
III (20 unités)	1/3 cent. cube sérum	+ 1/10 L +.	1/3
	1 cent. cube sérum	+ 1/10 L +.	
	1 cent. cube sérum	+ 1/20 L +.	

Une seconde série d'épreuves intradermiques est effectuée chez chaque lapin le quinzième jour après la dernière injection d'anatoxine.

En voici les résultats :

ANATOXINE EMPLOYÉE	NUMÉRO des lapins	1/200.000	1/100.000	1/50.000	1/20.000
I (7 unités)	1	—	—	—	—
	2	—	—	—	—
	3	—	—	+	++
II (12,5 unités).	4	—	—	—	—
	5	—	—	+	+
	6	—	—	+	+
III (20 unités)	7	—	—	—	—
	8	—	—	—	—
	9		Mort.		

Comme on peut en juger d'après ce tableau, l'immunité a progressé rapidement.

Les sérums sanguins recueillis le dix-huitième jour après la seconde injection contenaient :

Le sérum des lapins vaccinés avec l'anatoxine I (7 cent. cubes) + 1/25-1/15 unité.

Le sérum des lapins vaccinés avec l'anatoxine II (12 c. c. 5) + 1/20-1/15.

Le sérum des lapins vaccinés avec l'anatoxine III (20 cent. cubes) + 1/10-1/5.

L'épreuve intracutanée pratiquée le vingt-huitième jour après la seconde injection a fourni les résultats suivants :

ANATOXINE EMPLOYÉE	NUMÉRO des lapins	1/200.000	1/100.000	1/50.000	1/20.000	1/10.000	1/5.000
I (7 unités).	1			—	—	—	+
	2			—	—	+	+
	3	—	—	—	+		
II (12,5 unités)	4	—	+	—	—	—	—
	5	—	—	++	++	—	
	6			—	—	—	
III (20 unités)	7			—	—	—	—
	8			—	—	—	—

Le trente-quatrième jour, on effectue une nouvelle prise de sang.

Les sérums de chacun des groupes est titré.

Le sérum des lapins vaccinés avec l'anatoxine I titre $+ 1/10-1/4$ unité.

Le sérum des lapins vaccinés avec l'anatoxine II titre $+ 1/10-1/4$ unité.

Le sérum des lapins vaccinés avec l'anatoxine III titre $+ 1/10-1/4$ unité.

Voici d'ailleurs les détails du dosage :

SÉRUM DES LAPINS	UNITÉ correspondante	RÉSULTAT de l'expérience
I (7 unités) }	$1/2$	Mort en 2 jours.
	$1/4$	Mort en 2 jours.
	$1/10$	Survie avec escarre.
II (12,5 unités). }	$1/2$	Mort en 2 jours.
	$1/4$	Mort en 2 jours.
	$1/10$	Survie.
III (20 unités). }	$1/2$	Mort en 2 jours.
	$1/4$	Mort en 2 jours.
	$1/10$	Survie avec escarre.

Nous donnons ci-après les résultats des épreuves intradermiques pratiquées respectivement le quarante-sixième et le soixante-dixième jour après la deuxième injection :

ANATOXINES UTILISÉES pour les vaccinations des lapins	NUMÉRO des lapins	DILUTIONS DE TOXINE INJECTÉES DANS LE DERMÉ			
		1/500.000	1/100.000	1/20.000	1/5.000
<i>Quarante-sixième jour.</i>					
I (7 unités) . . . }	1			—	+
	2			—	+
	3		—	—	
II (12,5 unités). . }	4			—	—
	5	—	+	—	
	6		—	—	
III (20 unités) . . }	7			—	+
	8			—	+

ANATOXINES UTILISÉES pour les vaccinations des lapins	NUMÉRO des lapins	DILUTIONS DE TOXINE INJECTÉES DANS LE DERMÉ				
		1/100.000	1/20.000	1/10.000	1/5.000	1/1.000
<i>Soixante-dixième jour.</i>						
I (7 unités).	1		—		+	
	2		—		—	
	3		—	—		+
II (12,5 unités).	4		+		—	+
	5	—	—	+		
	6					
III (20 unités).	7		—		+	
	8		—		+	

Le titre antitoxique des sérums provenant d'une saignée effectuée le quatre-vingt-unième jour après la seconde injection a été le même pour les 3 groupes, soit : $1/5$ d'unité.

Enfin, les lapins ont été soumis à une dernière série d'épreuves intradermiques le quatre-vingt-deuxième jour après la seconde injection; les résultats ont été les suivants :

ANATOXINES EMPLOYÉES pour la vaccination des lapins	NUMÉRO des lapins	DILUTIONS DE TOXINE INJECTÉES DANS LE DERMÉ				
		1/20.000	1/10.000	1/5.000	1/2.000	1/1.000
I	1			—	—	
	2			—	+	
	3				—	+
II	4				—	—
	5	—	—			
	6		—	—		
III	7			—	+	
	8			—	+	

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES.

Dans cette deuxième série d'expériences, un lot de 9 lapins est divisé, lui aussi, en 3 groupes de chacun 3 lapins qui reçoivent :

Le premier groupe, l'anatoxine I, titrant par la floculation, 7 unités.

Le deuxième groupe, l'anatoxine III, 20 unités.

Le troisième groupe, l'anatoxine IV, 30 unités.

Les anatoxines I et III sont les mêmes que dans la première série d'expériences. Le protocole suivi pour l'immunisation des lapins est conforme à celui fourni au début de cet exposé : deux injections (1 et 2 cent. cubes) d'anatoxine, séparées par un intervalle de temps de trois semaines.

Le dix-huitième jour après la première injection d'anatoxine les animaux sont soumis à l'épreuve intradermique qui donne les résultats ci-dessous :

ANATOXINES EMPLOYÉES dans l'immunisation des lapins	NUMÉRO des lapins	DILUTIONS DE TOXINE INJECTÉES DANS LE DERMÈ	
		1/500.000	1/100.000
I (7 unités)	10	—	++
	11	+	++
	12	+	+
III (20 unités)	13	—	—
	14	—	+
	15	+	++
IV (30 unités)	16	—	+
	17	—	+
	18	—	+

Le jour même de la seconde injection et immédiatement avant, on fait une prise de sang. Le dosage des sérums révèle, pour les trois sérums « moyens » de chacun des groupes de lapins un titre inférieur à 1/60 d'unité.

Un nouveau dosage de l'antitoxine est effectué dans les sérums provenant d'une prise de sang effectuée le quatorzième jour après la seconde injection. En voici les détails et les résultats (voir le premier tableau de la page suivante).

La réaction intracutanée pratiquée le seizième jour après la deuxième injection donne les résultats consignés ci-dessous (voir le deuxième tableau de la page suivante).

MÉLANGE des sérum des lapins vaccinés avec l'anatoxine.	QUANTITÉS DE SÉRUM et doses de toxine	RÉSULTAT de l'épreuve chez les cobayes	TITRES antitoxiques
I (7 unités) . . .	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ cent. cube} + 1 \text{ L.} +. \\ 2 \text{ cent. cubes} + 1 \text{ L.} +. \\ 1 \text{ cent. cube} + 1/5 \text{ L.} +. \\ 1 \text{ cent. cube} + 1/10 \text{ L.} +. \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Mort en 1 jour.} \\ \text{Mort en 2 jours.} \\ \text{Mort en 3 jours.} \\ \text{Mort en 4 jours.} \end{array} \right.$	1/10 unité.
III (20 unités) . . .	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ cent. cube} + 1 \text{ L.} +. \\ 2 \text{ cent. cubes} + 1 \text{ L.} +. \\ 1 \text{ cent. cube} + 1/5 \text{ L.} +. \\ 1 \text{ cent. cube} + 1/10 \text{ L.} +. \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Mort en 2 jours.} \\ \text{Mort en 2 jours.} \\ \text{Mort en 5 jours.} \\ \text{Mort en 6 jours.} \end{array} \right.$	1/5 unité.
IV (30 unités) . . .	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ cent. cube} + 1 \text{ L.} +. \\ 2 \text{ cent. cubes} + 1 \text{ L.} +. \\ 1 \text{ cent. cube} + 1/5 \text{ L.} +. \\ 1 \text{ cent. cube} + 1/10 \text{ L.} +. \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Mort en 1 jour.} \\ \text{Mort en 2 jours.} \\ \text{Survie avec escarrie.} \\ \text{Survie.} \end{array} \right.$	+ 1/5 unité. — 1/2 unité.

ANATOXINE EMPLOYÉE dans l'immunisation des lapins	NUMÉRO des lapins	DILUTION DE TOXINE ÉTALON			
		1/100.000	1/20.000	1/5.000	1/1.000
I (7 unités) . . .	10	—	—	—	—
	11	—	—	+	++
	12	—	+	++	++
III (20 unités) . . .	13	—	—	—	++
	14	—	—	—	—
	15	—	—	—	—
IV (30 unités) . . .	16	+	+	+	++
	17	—	—	—	—
	18	—	—	—	—

Les sérums « moyens » de chaque groupe, prélevés le trente-septième jour, titrent tous les trois 1/10 d'unité.

Voici les résultats des épreuves intradermiques pratiquées le quarantième et le soixante et unième jour après la seconde injection (voir premier et deuxième tableaux de la page suivante).

Une dernière prise de sang a été faite le soixantième jour. Les mélanges de sérums titrent :

Pour les lapins ayant reçu l'anatoxine I. + 1/20-1/10
 Pour les lapins ayant reçu l'anatoxine II + 1/10-1/5
 Pour les lapins ayant reçu l'anatoxine III. + 1/10-1/5

ANATOXINE EMPLOYÉE dans l'immunisation des lapins	NUMÉRO des lapins	DILUTIONS DE TOXINE INJECTÉES DANS LE DERME							
		1/200.000	1/100.000	1/50.000	1/20.000	1/10.000	1/5.000	1/2.000	1/1.000
<i>Quarantième jour.</i>									
I (7 unités).	10					—	—	+	+
	11			—	+	+	++		
	12	—	—	—	+				
III (20 unités).	13				—		++	++	
	14					—	—	—	+
	15					—	—	—	+
IV (30 unités).	16	—	+						
	17					—	—	—	—
	18					—	—	—	+

ANATOXINE EMPLOYÉE dans l'immunisation des lapins	NUMÉRO des lapins	DILUTIONS DE TOXINE INJECTÉES DANS LE DERME							
		1/50.000	1/20 000	1/10.0 0	1/5.000	1/2.000	1/1.000	1/500	1/200
<i>Soixante et unième jour.</i>									
I (7 unités).	10				—	—	—	+	
	11	—	—	—	+				
	12				Mort.				
II (20 unités).	13				Mort.				
	14					—	—	—	+
	15					—	—	—	++
III (30 unités).	16	—	+						
	17					—	—	—	—
	18					—	—	—	—

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES.

Nous avons employé ici les mêmes échantillons d'anatoxine que dans les séries d'expériences précédentes : échantillons I, III et IV titrant respectivement 7 unités, 20 unités, 30 unités antigènes. Chacune de ces anatoxines a été injectée à un groupe de plusieurs lapins. De même que dans les essais pré-

ANATOXINE EMPLOYÉE dans l'immunisation des lapins	DOSES DE SÉRUM ET DE TOXINE injectées aux cobayes d'épreuves	RÉSULTAT de l'épreuve chez les cobayes	TITRE antitoxique
I (7 unités) . . .	1 cent. cube + 1 L +. 2 cent. cubes + 1 L +. 1 cent. cube + 1/5 L +. 1/10-1 cent. cube + 1/10 L +.	Mort en 2 jours. Mort en 2 jours. Survie. Survie.	+ 1/5-1/2 unité.
III (20 unités) . . .	1 cent. cube + 1 L +. 2 cent. cubes + 1 L +. 1 cent. cube + 1/5 L +. 1/10-1 cent. cube + 1/10 L +.	Mort en 2 jours. Mort en 2 jours. Survie. Survie.	+ 1/5-1/2 unité.
IV (30 unités) . . .	1 cent. cube + 1 L +. 2 cent. cubes + 1 L +. 5 cent. cubes + 1/5 L +. 1 cent. cube + 1/10 L +.	Mort en 2 jours. Mort en 4 jours. Survie. Survie.	1/2 unité.

cédents deux injections de 1 et 2 cent. cubes étaient faites à trois semaines d'intervalle.

Immédiatement avant la seconde injection, soit le vingt et unième jour après la première, les lapins ont subi une saignée d'épreuve. Le dosage de l'antitoxine effectué dans les sérums « moyens » obtenus par le mélange des sérums de lapins d'un même groupe a donné comme titre antitoxique :

Pour les lapins immunisés avec l'antitoxine I (7 unités) . . . + 1/60
 Pour les lapins immunisés avec l'anatoxine II (20 unités) . . . + 1/60-1/30
 Pour les lapins immunisés avec l'anatoxine III (30 unités) . . . + 1/30

ANATOXINE EMPLOYÉE dans l'immunisation des lapins	NUMÉRO des lapins	DILUTIONS DE TOXINE INJECTÉES DANS LE DERME			
		1/20.000	1/5.000	1/1.000	1/200
I (7 unités) . . .	19	—	—	—	+
	20	—	—	—	—
	21	—	—	+	++
	22	—	—	—	+
III (20 unités) . . .	24	+	+	++	++
	25	—	—	—	—
	26	—	—	—	—
	27	—	—	+	+
	28	—	—	—	—
IV (30 unités) . . .	29	—	—	—	—
	30	—	—	—	—
	31	—	—	++	++

Le dixième jour après la deuxième injection, une nouvelle saignée est pratiquée, suivie d'un nouveau dosage dont nous donnons ci-après les détails et les résultats (voir le premier tableau de la page précédente).

Des épreuves intradermiques sont pratiquées onze jours après la septième injection; on enregistre les résultats suivants (voir le deuxième tableau de la page précédente).

Nous donnons ci-dessous les conditions et les résultats du dosage de l'antitoxine dans les sérums prélevés le dix-septième jour après la deuxième injection :

ANATOXINE EMPLOYÉE dans l'immunisation des lapins	DOSES DE SÉRUM ET DE TOXINE injectées aux cobayes d'épreuves	RÉSULTAT de l'épreuve chez les cobayes	TITRE antitoxique
I (7 unités). . .	1 cent. cube + 1 L. +.	Mort en 2 jours.	1/5 unité.
	2 cent. cubes + 1 L. +.	Mort en 2 jours.	
	1 cent. cube + 1/5 L. +.	Mort en 5 jours.	
	1 cent. cube + 1/10 L. +.	Survie.	
III (20 unités). . .	1 cent. cube + 1 L. +.	Mort en 2 jours.	+ 1/5-1/2
	2 cent. cubes + 1 L. +.	Mort en 2 jours.	
	1 cent. cube + 1/5 L. +.	Survie.	
	1 cent. cube + 1/10 L. +.	Survie.	
IV (30 unités). . .	1 cent. cube + 1 L. +.	Mort en 2 jours.	1/2
	2 cent. cubes + 1 L. +.	Mort en 5 jours.	
	1 cent. cube + 1/5 L. +.	Survie.	
	1 cent. cube + 1/10 L. +.	Survie.	

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Afin de dégager plus aisément les déductions à tirer de nos expériences, nous avons d'abord groupé en deux tableaux (I et II) les résultats des épreuves intracutanées pratiquées chez chacun de nos lapins à différents moments de l'immunisation.

Ce qui frappe tout de suite à l'examen de ces tableaux, ce sont les différences individuelles considérables dans l'immunité acquise par les animaux, différences déjà signalées par de nombreux auteurs et tout dernièrement encore par G. Ramon et P. Nélis (1) au cours d'expériences effectuées dans des conditions comparables à celles de nos propres essais.

1. G. RAMON et P. NÉLIS. Ces *Annales*, 4, 1933.

TABLEAU I.

NUMÉRO d'anatoxine et unités antigènes	NUMÉRO des lapins	DATES DES ÉPREUVES intradermiques	UNITÉS INTRADERMIQUES								
			2	5	10	20	50	100	200	500	1.000
I (7 unités).	1	21 j. après 1 ^{re} injec.	—	—	—	+	—	—	—	—	—
		14 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		18 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		46 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		70 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		82 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	2	21 j. après 1 ^{re} injec.	+	+	++	++	—	—	—	—	—
		14 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	+	+	—	—
		28 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		46 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		70 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	+	—
		82 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	3	21 j. après 1 ^{re} injec.	—	++	++	++	++	—	—	—	—
		14 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	+	—	—	—	—
		28 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		46 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		70 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	+
		82 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	+
II (12,5 unités).	4	21 j. après 1 ^{re} injec.	—	+	+	++	—	—	—	—	—
		14 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		28 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		46 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		70 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	+
		82 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	5	21 j. après 1 ^{re} injec.	—	+	+	++	—	—	—	—	—
		14 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	+	+	—	—	—	—
		28 j. après 2 ^e injec.	—	—	+	++	++	—	—	—	—
		46 j. après 2 ^e injec.	—	—	+	—	—	—	—	—	—
		70 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	++	—	—	—	—
		82 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	21 j. après 1 ^{re} injec.	—	—	+	+	—	—	—	—	—
		14 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	+	+	—	—	—	—
		28 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		46 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	+	—	—	—
		70 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		82 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
III (20 unités).	7	21 j. après 1 ^{re} injec.	—	—	+	+	—	—	—	—	—
		14 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		28 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		46 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		70 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		82 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	8	21 j. après 1 ^{re} injec.	—	—	+	+	—	—	—	—	—
		14 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		28 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		46 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		70 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
		82 j. après 2 ^e injec.	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	9	21 j. après 1 ^{re} injec.	+	++	++	++	—	—	—	—	—
		Mort.	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLEAU II.

NUMÉRO d'anatoxine et unités antigènes	NUMÉRO des lapins	DATES DES ÉPREUVES Intradermiques	UNITÉS INTRADERMIQUES										
			2	5	10	20	50	100	200	400	1.000	2.000	5.000
IV (7 unités).	10	18 j. après 1 ^{re} injec.	—		+								
		16 j. après 2 ^e injec.			—								
		40 j. après 2 ^e injec.				—				+	+		
		61 j. après 2 ^e injec.						—		—	—	+	
	11	18 j. après 1 ^{re} injec.	+		++								
		16 j. après 2 ^e injec.			—				+		++		
		40 j. après 2 ^e injec.			—	+	+	+	++				
		61 j. après 2 ^e injec.			—	—	—	—	+				
	12	18 j. après 1 ^{re} injec.	+		+				++				
		16 j. après 2 ^e injec.		—	—		+						
		40 j. après 2 ^e injec.			—		+						
		Mort.											
V (20 unités).	13	18 j. après 1 ^{re} injec.	—	—	—								
		16 j. après 2 ^e injec.			—						++		
		40 j. après 2 ^e injec.				—	—	++	++				
		Mort.											
	14	18 j. après 1 ^{re} injec.	—		+								
		16 j. après 2 ^e injec.			—						—		
		40 j. après 2 ^e injec.						—	—		+		
		61 j. après 2 ^e injec.								—	—	—	
	15	18 j. après 1 ^{re} injec.	+		++								
		16 j. après 2 ^e injec.			—						—		
		40 j. après 2 ^e injec.					—		—		—		
		61 j. après 2 ^e injec.							—		—	—	
VI (30 unités).	16	18 j. après 1 ^{re} injec.	—		+								
		16 j. après 2 ^e injec.			+		+		+		++		
		40 j. après 2 ^e injec.	—	—	+								
		61 j. après 2 ^e injec.		—	—	—	+						
	17	18 j. après 1 ^{re} injec.	—		+								
		16 j. après 2 ^e injec.			—				—		—		
		40 j. après 2 ^e injec.			—			—	—		—		
		61 j. après 2 ^e injec.			—					—	—	—	
	18	18 j. après 1 ^{re} injec.	—		+								
		16 j. après 2 ^e injec.			—				—		—		
		40 j. après 2 ^e injec.						—	—		+		
		61 j. après 2 ^e injec.							—		—	—	

Nous constatons par exemple dans l'expérience n° 1 que le lapin n° 5 présente, lors des différentes épreuves, une immunité exprimée en unités intradermiques bien plus faible que les lapins 4 et 6 du même groupe (vaccinés exactement dans les mêmes conditions avec la même anatoxine, 12,5 unités antigènes). Dans la deuxième expérience, le lapin n° 16, vacciné de façon identique aux lapins 18 et 19 du même groupe (VI)

fait preuve d'une immunité considérablement plus faible que ceux-ci, puisque, par exemple, seize jours après la deuxième injection, le chiffre qui caractérise son immunité est inférieur à 10, alors que pour les deux autres il est supérieur à 1.000.

Néanmoins, pour l'étude de la marche de l'immunisation qui représente l'un des buts de notre travail, on peut faire abstraction de ces différences et envisager la courbe de l'immunité chez chaque lapin. En examinant les différentes courbes individuelles, on constate qu'en général l'immunité décelée par l'épreuve intracutanée est très faible après la première injection, elle croît brusquement dans les jours qui suivent la seconde. L'accroissement de l'immunité est progressif, il continue, pour un certain nombre de sujets, jusqu'au delà du quatre-vingt-deuxième jour (limite de nos examens); cet accroissement progressif de l'immunité est particulièrement net dans la première épreuve, il l'est moins dans la seconde. On remarque que chez les lapins vaccinés avec les échantillons d'anatoxine de faible valeur antigène intrinsèque (7 unités) l'immunité atteint plus tôt sa limite que chez ceux vaccinés au moyen de l'anatoxine ayant un pouvoir antigène élevé (20 et 30 unités). Cela est surtout visible dans la deuxième expérience. Il y aurait lieu d'entreprendre de nouvelles expériences pour expliquer cette sensible différence.

*
* *

Il semble très difficile, étant données les différences individuelles, d'apprécier au moyen des résultats de l'épreuve intradermique directe le degré d'immunité provoqué par les différents échantillons d'anatoxine. A peine peut-on se rendre compte, en comparant de très près les résultats obtenus dans chaque groupe d'animaux, que l'anatoxine III de l'expérience n° I confère une immunité de valeur supérieure à celles des anatoxines II (12,5) et I (7).

Il apparaît un peu plus nettement dans l'expérience II que l'immunité due à l'anatoxine IV (7 unités) est inférieure à celle qu'ont provoqué chez nos lapins les anatoxines V (20 unités) et VI (30 unités); cependant, entre ces deux dernières, la différence dans le pouvoir immunisant ne paraît guère appréciable,

TABLEAU III. — Titre antitoxique des mélanges de sérum correspondant à chaque groupe de lapins.

	NUMÉRO et valeur anatoxique	21 JOURS APRÈS 1 ^{re} injection	9 JOURS APRÈS 2 ^e injection	48 JOURS APRÈS 2 ^e injection	34 JOURS APRÈS 2 ^e injection	81 JOURS APRÈS 2 ^e injection
1 ^{re} exp.	I (7 unités) . .	— 1/60	+ 1/10-1/3	+ 1/20-1/15	+ 1/10-1/4	+ 1/5
	II (12,5 unités) . .	— 1/60	1/10	+ 1/20-1/15	+ 1/10-1/4	+ 1/5
	III (20 unités) . .	— 1/60	1/3	+ 1/10-1/5	+ 1/10-1/4	+ 1/5
	NUMÉRO et valeur anatoxique	21 JOURS APRÈS 1 ^{re} injection	14 JOURS APRÈS 2 ^e injection	37 ^e JOUR	60 ^e JOUR	
2 ^e exp.	I (7 unités) . .	— 1/60	1/10	1/10	+ 1/20-1/10	
	III (20 unités) . .	— 1/60	1/5	1/10	+ 1/10-1/5	
	IV (30 unités) . .	— 1/60	+ 1/5-1/2	1/10	+ 1/10-1/5	
	NUMÉRO et valeur anatoxique	21 JOURS APRÈS 1 ^{re} injection	10 JOURS APRÈS 2 ^e injection	17 ^e JOUR		
3 ^e exp.	I (7 unités) . .	+ 1/60	+ 1/5-1/2	1/5		
	III (20 unités) . .	+ 1/60	+ 1/15-1/2	+ 1/5-1/2		
	IV (30 unités) . .	+ 1/30	1/2	1/2		

l'un des 3 lapins, le n° 16, vacciné avec l'anatoxine 30 unités se montrant presque réfractaire à l'immunisation.

On peut, pour estimer comparativement les propriétés immunisantes de divers échantillons d'anatoxine, essayer de niveler les différences individuelles des animaux, en dosant l'antitoxine dans le mélange des sérums de chaque groupe de lapins vaccinés avec chacun des échantillons d'anatoxine. C'est ce que nous avons fait. Mais ici encore, pour l'appréciation des résultats, des difficultés se présentent. Examinons le tableau III qui récapitule partiellement les résultats de nos dosages. Nous

voyons, par exemple, que le titre antitoxique moyen des sérums de lapins immunisés avec la même anatoxine varie d'une expérience à l'autre, les animaux étant d'origine différente. Ainsi, si l'on compare les expériences n° II et n° III on constate que l'immunité provoquée dans chacune de ces expériences par les différents échantillons d'anatoxine, est, en général, plus forte dans l'expérience III que dans l'expérience II. De plus, dans chacune des expériences, le titre antitoxique des mélanges de sérum varie avec le moment du dosage. Passé un certain délai, par exemple le trente-cinquième jour après la seconde injection d'anatoxine, les titres antitoxiques, jusque-là différents, tendent à se stabiliser et à se maintenir à un même niveau; dans l'expérience n° I, par exemple, les sérums moyens des trois groupes qui avaient un titre différent le neuvième jour ont un titre identique le trente-quatrième jour, $+1/10-1/4$ d'unité; ce titre est encore le même le quatre-vingt-unième jour pour les 3 sérums envisagés : $1/5$ d'unité.

Malgré tout, en examinant les taux moyens d'antitoxine des sérums prélevés du neuvième au vingtième jour après la deuxième injection on peut avoir une idée, très approximative d'ailleurs, de la valeur immunisante comparée des divers échantillons d'anatoxine utilisés dans nos essais.

Ainsi, dans l'expérience n° II, si l'on s'en rapporte au dosage de l'antitoxine dans les sérums provenant de la saignée pratiquée le quatorzième jour qui suit la seconde injection d'antigène, le pouvoir immunisant de l'anatoxine IV (7 unités) se montre inférieur à celui de l'anatoxine V (20 unités) qui lui-même est inférieur à celui de l'anatoxine VI (30 unités). Il en est de même dans l'expérience III.

Donc, que l'on estime l'immunité à l'aide de la réaction intracutanée, ou qu'on apprécie en dosant l'antitoxine, on peut dire que la valeur immunisante de l'anatoxine chez un nombre forcément restreint d'animaux demeure très relative; si elle dépend du pouvoir antigène, elle dépend aussi de l'espèce animale utilisée, de l'individualité des animaux, de la technique employée, etc., comme l'a démontré G. Ramon (1).

(1) Voir en particulier : G. RAMON. Ces *Annales*, 39, p. 1; *ibid.*, 42, 1928, p. 959; *ibid.*, 46, 1931, p. 483. G. RAMON et P. NÉLIS. Ces *Annales*, 50, 1933, p. 66. G. RAMON. C. R. de la Soc. de Biol., 112, 1933, p. 1304.

*
* *

Mais, ce que nous apprennent ainsi l'épreuve toxinique directe ou le dosage de l'antitoxine, non sans peine et au prix de nombreuses difficultés, un autre moyen d'appréciation que nous avons à notre disposition : la méthode de floculation nous le fait connaître avec infiniment plus de facilités et une précision aussi grande qu'il est désirable. Au premier coup d'œil sur le chiffre qui accompagne le numéro d'ordre de chaque échantillon d'anatoxine et qui exprime en unités de floculation — 7, 12, 20, 30 unités — la valeur antigène intrinsèque de ces échantillons, nous sommes fixés. Les essais d'immunisation chez nos lapins, prolongés pendant plusieurs mois, les multiples épreuves intracutanées, les très nombreux dosages d'antitoxine n'ont fait que nous apporter la confirmation, sans précision d'ailleurs, de ce que la réaction de floculation nous avait fait connaître en quelques instants. Comme l'a établi G. Ramon, la floculation permet d'estimer facilement et aussi exactement que possible la valeur antigène intrinsèque de chaque échantillon d'anatoxine ou autrement dit le pouvoir qui appartient à tout échantillon de provoquer une immunité spécifique plus ou moins forte chez tels ou tels organismes vivants capables d'acquérir cette immunité. Et cette estimation se révèle particulièrement exacte en ce qui concerne l'immunité que détermine l'anatoxine chez l'homme.

En effet, les essais comparatifs d'immunisation effectués en particulier par G. Ramon, P. Nélis, d'une part, par G. Ramon, Robert Debré et ses collaborateurs d'autre part (1) chez des milliers de sujets, au moyen d'anatoxines de valeur antigène intrinsèque différente, ont définitivement prouvé la valeur de la méthode de floculation pour l'appréciation de l'activité immunisante de l'anatoxine chez l'homme.

(1) G. RAMON et P. NÉLIS. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **105**, 1930, p. 500; *id.*, **107**, 1931, p. 487. G. RAMON, R. DEBRÉ, M. et G. MOZER. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **107**, 1931, p. 485. G. RAMON, G. TIMBAL et P. NÉLIS. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **109**, 1932, p. 1258. G. RAMON et P. NÉLIS. *Bull. de l'Acad. de Méd. de Belgique*, 1931, p. 478; G. RAMON. *Bull. de la Soc. ital. de Pédiatrie*, 1932; G. RAMON, G. TIMBAL et P. NÉLIS. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 543.

CONCLUSIONS

Le degré d'immunité provoquée chez le lapin par deux injections (1 cent. cube et 2 cent. cubes) d'anatoxine diphtérique effectuées à trois semaines d'intervalle varie beaucoup d'un animal à l'autre.

Ces différences individuelles mises à part, l'immunité appréciée au moyen d'épreuves intradermiques à la toxine que l'on pratique périodiquement, croît brusquement, quelques jours après la deuxième injection ; l'accroissement progresse en général durant quelques semaines, jusqu'au delà du troisième mois chez certains animaux.

Les dosages d'antitoxine spécifique effectués au cours de l'immunisation dans le mélange des sérums de plusieurs lapins vaccinés avec la même anatoxine montrent qu'en général le pouvoir antitoxique augmente pendant les deux ou trois semaines qui suivent la deuxième injection d'anatoxine, puis baisse et se maintient ensuite pendant un temps plus ou moins long, à un niveau qui tend à s'égaliser chez les divers, groupes de lapins traités par des échantillons d'anatoxine de pouvoir antigène différent.

Il est bien difficile d'apprécier chez le lapin la valeur immunisante de différents échantillons d'anatoxine, soit que l'on s'adresse à l'épreuve intradermique directe, soit que l'on utilise le dosage de l'antitoxine dans le mélange des sérums de lapins immunisés avec chaque échantillon. Ce que nous apprend, avec une approximation toute relative, une expérimentation chez l'animal toujours délicate, prolongée, coûteuse, dont les résultats essentiellement variables sont difficiles à interpréter, la méthode de floculation nous le fait connaître rapidement avec une précision aussi grande qu'il est possible de l'obtenir.

SUR L'ALLERGIE COMPARÉE A LA TUBERCULINE ET AUX FILTRATS D'ULTRAVIRUS TUBERCULEUX,

par J. VALTIS, G. PAISSEAU et F. VAN DEINSE.

(*Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur la tuberculose.*)

Dans une série de notes présentées à la Société de Biologie et à la Société médicale des Hôpitaux, nous avons démontré la présence de virus tuberculeux à l'état invisible et filtrable (ultravirus) dans différents produits pathologiques provenant de lésions manifestement tuberculeuses ou suspectes.

Il nous a paru dès lors intéressant de rechercher si l'allergie tuberculeuse pouvait être mise en évidence par l'inoculation intradermique de *filtrats chauffés*, provenant de cultures en voiles jeunes de bacilles de Koch en milieu synthétique de Sauton (1).

Au cours de nos recherches, nous avons pu constater que certains sujets, bien que réagissant à l'épreuve intradermique au filtrat, répondaient négativement aux injections intradermiques de dilutions de tuberculine, même concentrées.

Ces faits nous ont incités à étendre nos investigations à un assez grand nombre d'enfants soit atteints, soit suspects de tuberculose, depuis l'âge d'un mois jusqu'à quinze ans, présentant une cuti-réaction tuberculinique négative. Nous relatons dans ce bref mémoire les résultats des constatations que nous avons faites à ce sujet.

TECHNIQUE.

Les injections intradermiques de tuberculine et de filtrats d'ultravirus aux doses que nous avons adoptées ne doivent être employées que chez les sujets à cuti-réactions nettement négatives. Si l'on ne prenait pas cette précaution, on s'exposerait à

(1) Déjà F. Arloing et Dufourt, Josserand et Charençon, Paraf et Mantoux, Popper et Raileanu, et enfin P. Nélis, avaient tenté de mettre en évidence l'allergie tuberculeuse chez l'homme ou chez les animaux par inoculation intra-dermique de filtrats de cultures de B. tuberculeux.

des réactions locales intenses, souvent douloureuses, parfois même accompagnées d'inflammation lymphatique locale.

DOSES. — Nous nous sommes arrêtés aux doses suivantes :

1° *Pour la tuberculine* : injection de 1/10 de centimètre cube d'une dilution au 1/100 de tuberculine brute de l'Institut Pasteur. Les injections de la même quantité de tuberculine moins diluée présentent certains inconvénients au point de vue des réactions tant générales que locales, surtout chez les jeunes sujets. En outre, leur caractère spécifique est troublé par l'action irritante que cette substance semble exercer parfois sur la peau et qui est le propre des solutions glycérinées concentrées de diverses peptones.

2° *Pour le filtrat d'ultravirus* : celui-ci, ainsi que nous l'avons indiqué avec P. Ravaut, est préparé de la façon suivante :

On utilise exclusivement les cultures en voiles de six à huit jours, développées sur 100 cent. cubes de milieu synthétique de Sauton dans un ballon de 250 cent. cubes. Après avoir décanté le liquide nutritif, ces voiles sont émulsionnés, au moyen de billes de verre, dans 10 cent. cubes d'eau physiologique stérile pour chaque ballon, et l'émulsion ainsi obtenue est filtrée en huit à dix minutes sur bougie Chamberland L2 neuve, sous une dépression de 20 millimètres de mercure. Le filtrat est réparti en ampoules de 1 cent. cube et chauffé deux jours de suite pendant une heure à la température de 80°.

Pour mettre en évidence l'allergie tuberculeuse, nous nous sommes arrêtés à l'injection intradermique de 1/10 de centimètre cube de ce filtrat pur.

Nous avons observé que toutes les souches de bacilles de Koch ne donnent pas des filtrats également actifs. Ce sont les filtrats issus de souches (nous en possédons plusieurs dans les collections du laboratoire) riches en ultravirus, qui donnent des réactions intenses. Le filtrat semble perdre son activité avec le vieillissement après quelques semaines ou quelques mois, selon les conditions de sa conservation qui s'effectue le mieux en maintenant les ampoules à l'abri de la lumière et en frigidifiant.

Toutefois nous conseillons, pour rechercher l'allergie à

l'ultravirus, d'utiliser des filtrats récemment préparés, afin d'éviter toute erreur dans la lecture des réactions.

Normalement, les deux réactions au filtrat et à la tuberculine se montrent sensiblement équivalentes chez les sujets déjà allergiques.

*
* *

Les résultats de nos recherches peuvent être ainsi résumés :

A. RÉACTIONS CONCORDANTES A LA TUBERCULINE ET AU FILTRAT. — Elles sont la règle, pour ainsi dire absolue, chez les sujets à cuti-tuberculinisation positive, et elles présentent alors fréquemment une telle intensité que nous avons dû renoncer à pratiquer des intradermoréactions chez ces sujets.

Chez les enfants à cuti-tuberculinisation négative jusqu'à l'âge de quinze ans, nous avons obtenu des intradermo-réactions concordantes au filtrat et à la tuberculine dans la proportion de 30 p. 100. Ainsi qu'il est généralement admis, la réaction intradermique de Mantoux s'avère plus sensible que la cuti de Pirquet.

Cette proportion des intradermo-réactions positives chez les sujets à cuti négative semble progresser avec l'âge (23 p. 100 pendant la première année, 45 p. 100 de onze à quinze ans). Mais il ne faut pas attribuer à ces chiffres une valeur absolue, nos explorations ayant été souvent faites de préférence dans des cas cliniquement suspects.

Les intradermo-réactions positives au filtrat ont été d'une intensité relativement discrète, mais nous avons observé tous les intermédiaires entre les intradermo-réactions fortement positives et les négatives. On rencontre même un assez grand nombre de réactions douteuses ou faibles dont on peut tenir compte; mais pour l'établissement de la statistique que nous rapportons ici, nous n'avons retenu que les réactions persistantes après quarante-huit heures, caractérisées par une papule nettement perceptible à la vue et au toucher, avec rougeur de 2 millimètres de diamètre.

B. RÉACTIONS DISSOCIÉES. — Dans un certain nombre de cas, cette concordance entre les réactions à la tuberculine et au

filtrat ne se retrouve plus. Les plus intéressantes de ces réactions, que nous appellerons *réactions dissociées*, sont celles où l'intradermo-réaction à la tuberculine étant négative, la réaction au filtrat est nettement positive. Cette dissociation est peu fréquente, puisque nous ne l'avons rencontrée que chez 8,5 p. 100 des sujets étudiés; mais elle est plus communément observée tout au moins chez l'enfant où elle atteint la proportion de 22 p. 100 si l'on établit le pourcentage par rapport aux réactions positives.

Il semble que cette réaction dissociée subisse, selon l'âge des sujets, de notables variations de fréquence. Elle présente en effet deux maxima qui paraissent assez nets : pendant la première année et entre les sixième et dixième années, où les réactions dissociées atteignent la proportion de 10,7 p. 100 du total des réactions effectuées et de 32 p. 100 lorsque le pourcentage est établi par rapport aux réactions positives.

Par contre, pendant la deuxième année de vie, ces réactions dissociées sont beaucoup plus rares : leur proportion est de 3,1 p. 100 seulement du total des sujets éprouvés et de 9,3 p. 100 des réagissants. Cette différence est encore plus marquée si l'on décompose la première année : pendant les deux premiers mois, la proportion des réactions positives au filtrat est de 14 p. 100 des sujets éprouvés et de 40 p. 100 des réagissants. Pendant les troisième et quatrième mois, elle est de 16 p. 100 des éprouvés et de 50 p. 100 des réagissants.

C. RÉACTIONS INCOMPLÈTES. — Nous classons sous cette rubrique les cas dans lesquels une des deux réactions est sensiblement plus discrète que l'autre, ou est douteuse. Il nous a paru légitime de ne pas comprendre ces dissociations incomplètes ou douteuses dans nos relevés des réactions dissociées.

*
* *

Les résultats de nos intradermo-réactions comparées à la tuberculine et aux filtrats montrent que certains sujets, bien qu'encore insensibles à la tuberculine, réagissent positivement aux filtrats d'ultravirus tuberculeux et, fait encore plus intéressant, ces réactions « dissociées » s'observent surtout fré-

quemment pendant les deux premiers mois qui suivent la naissance.

Depuis un certain temps déjà, M. le professeur A. Calmette et ses collaborateurs J. Valtis et M. Lacomme ont établi, par l'inoculation aux cobayes, sans filtration préalable des organes macroscopiquement sains de nourrissons issus de mères tuberculeuses, la présence dans ceux-ci d'ultravirus tuberculeux, alors qu'il n'existait aucun bacille acido-résistant de virulence normale. De cette constatation est née la conception admise presque généralement aujourd'hui d'une hérédité transplacentaire due à la transmission, de la mère à l'enfant, du virus tuberculeux à son stade invisible et filtrable.

Chez l'adulte, des résultats analogues obtenus par nous après inoculation aux cobayes d'humeurs et de divers produits pathologiques non filtrés, conduisaient à la même conclusion que certains états pathologiques sont en relation avec l'ultravirus.

On peut invoquer à l'appui de cette hypothèse des arguments suggérés par les conditions cliniques dans lesquelles ces intradermo-réactions ont été effectuées et d'autres arguments d'ordre expérimental que nous nous sommes efforcés d'établir par les examens bactériologiques portant sur les sujets à intradermo-réactions dissociées.

Au point de vue clinique, on doit d'abord relever cette particularité que les intradermo-réactions dissociées s'observent avec une inégalité assez remarquable aux différents âges de l'enfance, comme en témoignent les chiffres que nous avons pu relever.

De ces chiffres ressort une fréquence particulière des intradermo-réactions dissociées pendant la première année et entre les sixième et dixième années de la vie.

Si cette fréquence des intradermo-réactions dissociées entre les sixième et dixième années ne peut guère être actuellement expliquée de façon satisfaisante, par contre l'augmentation de fréquence de la dissociation au cours de la première année permet de se demander si cette particularité ne correspond pas à la notion de la transmission par voie placentaire de l'ultravirus tuberculeux qui aurait infecté *in utero* les enfants réagissant uniquement aux filtrats tuberculeux. Un argument en faveur de cette manière de voir est le nombre très élevé des

réactions dissociées que l'on observe pendant les quatre premiers mois de la vie.

Malheureusement, les conditions défectueuses où nous étions placés pour rechercher les antécédents des enfants qui ont présenté ces réactions dissociées ne nous permettent pas d'émettre une conclusion formelle à ce sujet.

L'étude clinique des malades chez lesquels ces réactions ont été notées semble apporter certaines présomptions. Il s'agit le plus souvent de sujets atteints d'affections au cours desquelles nous avons eu déjà l'occasion de noter la présence de l'ultravirus tuberculeux : pneumopathies aiguës ou chroniques d'apparence normale, rhumatismes de nature tuberculeuse, néphrites, et enfin états divers dont les relations avec cette forme particulière de la tuberculose dite *inflammatoire* peuvent être envisagées.

Mais cet argument ne saurait actuellement être retenu que dans la mesure où il serait possible de démontrer l'existence d'une concordance entre les réactions dissociées et la présence de l'ultravirus tuberculeux dans les produits pathologiques provenant des enfants ayant ainsi réagi.

Aussi avons-nous procédé systématiquement à l'examen bactériologique des sujets chez lesquels nous avons relevé l'existence d'une intradermo-réaction dissociée.

Exclusion faite d'une douzaine d'inoculations et ensemencements accidentellement interrompus, nous avons procédé à l'étude bactériologique de divers produits provenant de 18 sujets à intradermo-réactions dissociées et de 2 sujets ayant réagi à la tuberculine et non au filtrat.

Chez les 18 sujets à intradermo-réaction dissociée nous avons eu 7 résultats négatifs et 11 positifs.

Chez les 11 malades pour lesquels les examens du laboratoire ont été positifs, nous avons inoculé ou ensemencé six fois les crachats, trois fois les urines, une fois le sang circulant et une fois le liquide céphalo-rachidien.

Les résultats furent les suivants : dans 7 cas nous avons pu mettre en évidence, par inoculation aux cobayes, la présence de l'ultravirus tuberculeux. Dans 2 cas nous avons obtenu, par l'ensemencement sur milieu à l'œuf-asparagine de Löwenstein, l'apparition de colonies microscopiques constituées par des bacilles avirulents pour le cobaye et non repiquables ; ces

colonies microscopiques, qui ne se développent pas par la suite en colonies apparentes, représentent à notre avis le premier stade cultivable de l'ultravirus tuberculeux. Dans un cas où il s'agissait d'inoculation au cobaye d'un liquide céphalo-rachidien de méningite tuberculeuse, nous avons pu mettre en évidence dans celui-ci un bacille de virulence normale. Enfin, 1 cas est encore en cours d'étude.

Il y a donc concordance complète entre les résultats des intradermo-réactions uniquement positives aux filtrats et ceux des inoculations et ensemencements.

Cet argument de très haute valeur en faveur de la signification des intradermo-réactions dissociées ne nous paraît pas devoir être infirmé par le seul résultat discordant qui concerne le liquide céphalo-rachidien de méningite tuberculeuse, en raison des anomalies bien connues des réactions tuberculiniques chez cette catégorie de malades.

La signification que nous attribuons à la concordance de ces épreuves est confirmée par les résultats fournis par les inoculations au cobaye chez deux sujets qui ont présenté une réaction intradermique positive à la tuberculine et négative au filtrat. En effet, chez ces deux sujets, nous avons pu isoler des bacilles de Koch typiques et de virulence normale.

Il nous a paru légitime de faire ressortir la concordance tout à fait remarquable qui se révèle entre les épreuves intradermiques à la tuberculine et celles aux filtrats tuberculeux. A une exception près, et parfaitement explicable, elles attestent que l'ultravirus existe surtout chez les sujets non réagissants à la tuberculine et réagissants seulement au filtrat.

Nous croyons, en conséquence, que les réactions intradermiques aux filtrats d'ultravirus tuberculeux ont une réelle valeur clinique. Outre qu'elles peuvent vraisemblablement servir à révéler l'existence d'une allergie spécifique chez les nouveau-nés i-sus de mères tuberculeuses et infectés *in utero* par l'ultravirus tuberculeux, il va devenir possible de les utiliser pour le diagnostic précoce des formes d'infection tuberculeuse inflammatoire dans lesquelles l'ultravirus joue un rôle de premier plan. Toutefois nous estimons que, pour le moment, ces conclusions ne valent que pour l'enfant, car nous n'avons pas encore étendu nos recherches aux sujets adultes.

**SUR UN BACILLE TUBERCULEUX A COLONIES LISSES
ET RUGUEUSES ISOLÉ DES URINES
D'UN MALADE ET DÉCELÉ PAR LA MÉTHODE
DES INJECTIONS D'EXTRAIT ACÉTONIQUE
DE BACILLES DE KOCH,**

par L. NÈGRE et J. VALTIS.

(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la tuberculose).

Dans un mémoire antérieur, nous avons montré que les injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles de Koch favorisent le développement des lésions tuberculeuses chez les cobayes préalablement inoculés avec les éléments filtrables du virus tuberculeux.

A la suite de ces résultats, nous avons pensé que les injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux, à raison de deux ou trois par semaine, pourraient être utilisées avec profit pour faciliter la mise en évidence du virus tuberculeux dans des produits pathologiques suspects de tuberculose, soit parce que les bacilles de Koch y sont très rares, soit parce qu'il est constitué par des éléments filtrables.

Les expériences que nous avons effectuées seuls ou en collaboration avec F. van Deinse, A. Saenz et J. Beerens nous ont montré que, par cette méthode, on peut obtenir le virus tuberculeux dans des cas où l'examen microscopique, l'ensemencement direct sur un milieu à l'œuf et l'inoculation seule ont donné des résultats négatifs.

Dans la plupart des cas, aussi bien à partir de filtrats de produits pathologiques que de ces produits inoculés tels quels, nous avons obtenu des bacilles tuberculeux dont les caractères se rapprochent de ceux de la souche qui fait l'objet de ce mémoire et que nous avons isolée avec Guy Laroche des urines d'un malade atteint de néphrite hématurique.

En même temps, van Deinse, puis Valtis et van Deinse ont montré qu'à partir de cobayes inoculés avec des filtrats sur

bougie Chamberland L, d'une souche bovine virulente, on peut obtenir des bacilles dont les caractères sont semblables à ceux du germe que nous allons décrire.

EXPÉRIENCE. — Le 14 novembre 1930, 8 cobayes sont inoculés sous la peau de l'aîne droite avec le culot de centrifugation des urines de M. B., dont l'examen microscopique n'avait pas révélé de bacilles de Koch. 5 d'entre eux sont traités deux fois par semaine par des injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles de Koch. 3 sont conservés comme témoins. 2 cobayes traités et 2 témoins meurent dans le mois suivant l'inoculation, sans hypertrophie ganglionnaire. Le 12 décembre, 2 cobayes traités meurent avec leurs ganglions inguinaux et sous-lombaires droits hypertrophiés, sans qu'on puisse y déceler des bacilles de Koch. 1 cobaye témoin, mort le même jour, ne présente aucune hypertrophie ganglionnaire.

Le 8 janvier 1931, le dernier cobaye traité est sacrifié. Ses ganglions inguinaux et sous-lombaire droits, ses ganglions trachéo-bronchiques et sa rate, granuleuse, sont augmentées de volume. Bien que la recherche des bacilles de Koch dans ces ganglions soit négative, ceux-ci sont broyés et inoculés le même jour sous la peau de 8 cobayes.

4 des cobayes ainsi traités sont soumis à des injections bihebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch; 4 sont conservés comme témoins. Alors que 3 de ces derniers, morts dans le mois suivant l'inoculation, ne présentent aucune hypertrophie ganglionnaire, 2 cobayes traités, morts le 30 janvier et le 10 février, ont leur ganglion inguinal droit hypertrophié, spécialement chez le second où l'on décèle des bacilles de Koch. Les deux derniers cobayes traités et le quatrième témoin sont sacrifiés le 10 juin. Tous trois ont les mêmes lésions : hypertrophie peu marquée des ganglions de l'aîne droite, et plus prononcée des ganglions sous-lombaires droits et trachéo-bronchiques, avec abcès intramusculaire au point d'inoculation. L'ensemencement de ce pus et des ganglions broyés, fait séparément pour chaque cobaye sur milieu de Dorset-Petroff, a donné lieu dans chaque cas au développement, au bout de cinq semaines, d'une culture de bacilles acido-résistants.

CARACTÈRES DE LA CULTURE A ASPECT LISSE.

La culture ainsi obtenue s'est présentée sous la forme d'un grand nombre de petites colonies blanches et rondes, opaques, à surface lisse et humide (fig. 1), formées par un *bacille acido-résistant fin et court dont certains éléments se présentent sous la forme d'un petit coccobacille* (fig. 3). Repiqués sur pomme de terre au bouillon glyciné, ces germes s'y développent lentement en quatre à cinq semaines en donnant une culture d'aspect blanc crémeux, à surface lisse et humide, de consistance visqueuse, qui s'étend sur le bouillon sous la forme d'un voile à peine perceptible et qui le trouble. Reporté en ballon de bouillon

glycériné, ce bacille s'y multiplie dans la masse du liquide en donnant des flocons, puis un trouble général avec dépôt pulvérulent dans le fond. Il ne se développe pas sur les milieux non glycérinés. La température de culture optima est de 37°-38°. Au-dessus, le développement du germe est de moins en moins prononcé. Il ne pousse presque pas à 24°, et pas du tout à la température du laboratoire. Il acidifie le milieu de culture dans lequel il se développe.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA CULTURE A ASPECT LISSE.

Inoculé au cobaye, sous la peau de l'aîne droite, à la dose de 10 milligrammes, ce germe provoque l'apparition de lésions caséuses des ganglions inguinaux et sous-lombaires du même côté, contenant de nombreux bacilles acido-résistants. Aucune extension aux organes ne se produit; mais on note souvent dans le voisinage du ganglion inguinal un abcès dont le pus fourmille de bacilles. Si on inocule ce germe dans la veine du lapin, à la dose de 10 milligrammes, cet animal meurt au bout de quinze à seize jours, sans aucune lésion nodulaire; le foie à aspect de feuille morte et la rate, hypertrophiés et congestionnés, contiennent un nombre énorme de bacilles acido-résistants.

Ceux-ci, très nombreux également dans la moelle osseuse, sont en quantité un peu moindre dans les poumons, les reins et les surrénales. Après inoculation intraveineuse au lapin de 1 milligramme ou 1/100 de milligramme, les animaux ne meurent qu'au bout de vingt-cinq à trente jours. Les lésions sont les mêmes qu'après l'inoculation de 10 milligrammes. Les bacilles sont cependant un peu moins nombreux dans les organes et on peut voir un semis de fines granulations sur les poumons ou sur la rate.

Des poules, inoculées dans la veine avec des doses de ce bacille variant entre 1/100 de milligramme et 10 milligrammes, meurent en vingt-cinq à trente jours; le foie et la rate, hypertrophiés, présentent quelques fines granulations très rares et contenant un nombre énorme de bacilles.

Chez les poules inoculées dans la veine avec 0 milligr. 001 de ce germe, les granulations sont plus nombreuses et les bacilles

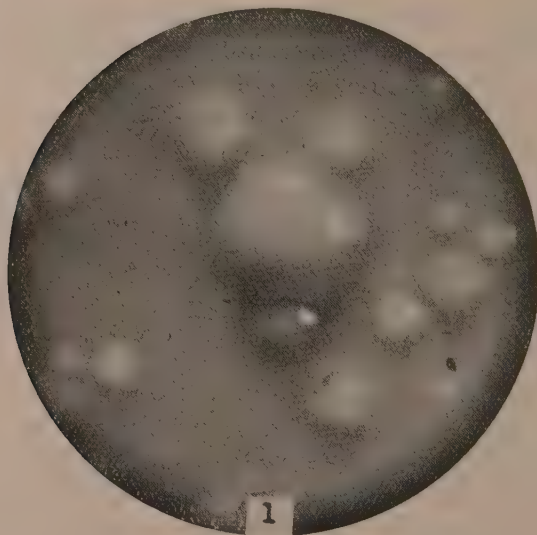


FIG. 1.

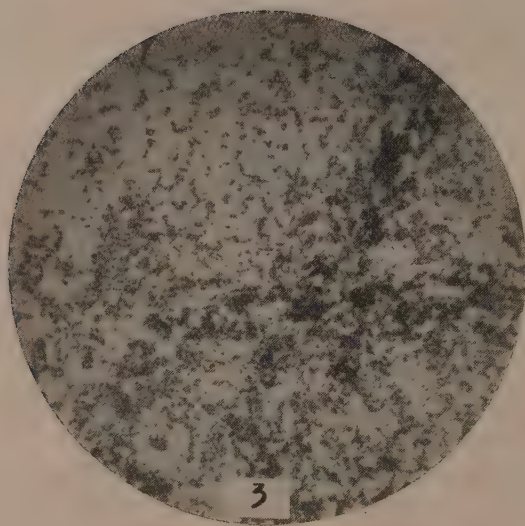


FIG. 3.

FIG. 1. — Colonies S sur le milieu de Löwenstein, âgées de 4 semaines. $\times 3$.

FIG. 3. — Bacilles des colonies S. $\times 900$.

(Photographies dues comme les suivantes à l'obligeance de M. Birkhaug).

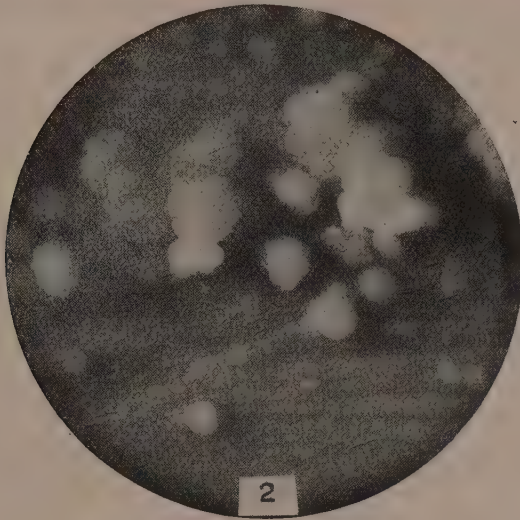


FIG. 2.

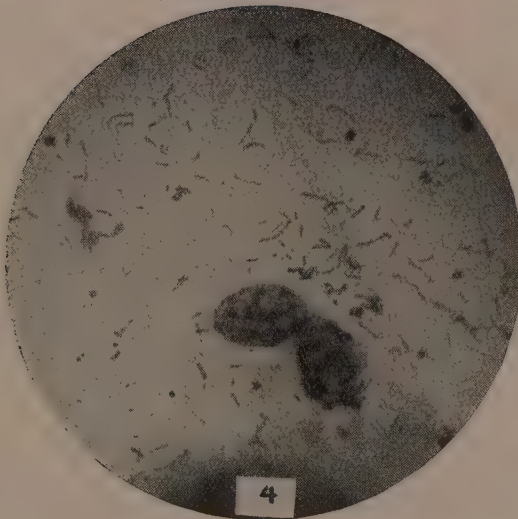


FIG. 4.

FIG. 2. — Colonies R sur le milieu de Löwenstein, âgées de 4 semaines. $\times 1.5$.

FIG. 4. — Bacilles des colonies R dans une lésion. $\times 900$.

plus rares qu'avec les doses comprises entre 0 milligr. 01 et 10 milligrammes.

Chez celles qui ont reçu dans la veine 0 milligr. 0001 de cette souche, la mort se produit au bout de quarante-cinq jours environ. On observe une granulie intense du foie et de la rate. Les bacilles sont encore plus rares dans les organes que pour la dose précédente.

Après inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale de 1 milligramme de cette souche à des rats, ceux-ci n'ont présenté aucune lésion macroscopique, sauf un seul inoculé dans le péritoine, qui avait quelques granulations sur les poumons, contenant des bacilles. Les organes des autres n'en ont pas révélé.

3 souris ont été inoculées avec 1 milligramme de ce germe dans le péritoine. Sacrifiées deux mois après, elles ne présentaient aucune lésion visible, mais leurs organes contenaient un nombre énorme de bacilles.

Nous aurions pu penser, comme pour la souche isolée avec Saenz par la même méthode d'un filtrat de liquide de pyopneumothorax, qu'il s'agissait d'un bacille aviaire, si l'un des tubes du milieu à l'œuf ensemencé avec les lésions ganglionnaires du cobaye (deuxième passage de l'urine) n'avait présenté un changement dans l'aspect de sa culture. Celle-ci, d'abord lisse, est devenue rugueuse. Réensemencée sur pomme de terre glycérinée, elle a achevé d'y reprendre l'aspect rugueux et sec (fig. 2) qui caractérise les cultures des bacilles des mammifères.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA CULTURE A ASPECT RUGUEUX.

Des lapins ont été inoculés dans la veine avec 0 milligr. 01, 1 milligramme et 10 milligrammes de cette souche rugueuse.

Après inoculation de 0 milligr. 01, un lapin n'a présenté après deux mois aucune lésion; un autre trois ou quatre granulations sur les poumons avec de très rares bacilles.

Au bout de la même période, ceux inoculés avec 1 milligramme n'avaient sur les poumons que quelques tubercules contenant peu de bacilles. Chez ceux qui avaient reçu 10 milligrammes, les poumons, un mois après l'inoculation, présentent quelques granulations; les bacilles y sont peu abondants. Le foie et la rate hypertrophiés contiennent quelques rares bacilles.

Deux cobayes inoculés sous la peau avec 1 milligramme de cette souche présentaient, l'un, sacrifié après un mois après l'inoculation, une hypertrophie des ganglions inguinaux et sous-lombaire droits contenant de nombreux bacilles; l'autre, sacrifié au bout de deux mois, un ganglion inguinal caséux, un ganglion sous-lombaire hypertrophié et une grosse rate avec présence de bacilles.

4 cobayes ont été inoculés sous la peau avec 10 milligrammes de la culture rugueuse. L'un, mort au bout d'un mois, avait un ganglion inguinal hypertrophié avec point caséux, contenant des bacilles. Un autre, sacrifié après six semaines, présentait des lésions ganglionnaires caséuses et une grosse rate contenant des bacilles. Les deux derniers, sacrifiés deux mois après l'inoculation, avaient les mêmes lésions ganglionnaires et des tubercules sur la rate, le foie et les poumons.

L'inoculation à la poule, dans la veine, de 1 et 10 milligrammes de cette souche n'a déterminé l'apparition d'aucune lésion. Les organes ne contenaient pas de bacilles.

Deux souris inoculées dans le péritoine avec un milligramme ne présentaient au bout de deux mois aucune lésion visible. Chez l'une d'elles, les bacilles étaient nombreux dans le foie, plus rares dans les poumons et la rate; chez l'autre, plus nombreux dans les poumons et plus rares dans le foie et la rate.

Dans ces inoculations, la souche rugueuse s'est comportée comme un bacille de type humain peu virulent.

EXPÉRIENCES DE PASSAGES CHEZ LES ANIMAUX.

a) *Souche rugueuse.*

EXPÉRIENCE. — Le 15 octobre 1931, 2 lapins reçoivent dans la veine 10 milligrammes de la souche B. ayant repris l'aspect rugueux.

Ils sont sacrifiés le 9 décembre 1931. L'un présente de nombreuses granulations sur les poumons, l'autre n'en a que quelques-unes. Les autres organes sont indemnes.

Les poumons sont broyés et inoculés sous la peau de 3 cobayes le 9 décembre 1931.

Le 30 décembre 1931, 1 cobaye meurt avec un ganglion inguinal hypertrophié contenant des bacilles de Koch.

Le 14 janvier 1932, les deux autres sont sacrifiés. L'un présente des lésions

généralisées aux organes, l'autre de nombreux tubercules sur la rate, plus rares sur le foie et les poumons.

Les organes sont broyés, traités par l'acide sulfurique, ensemencés sur milieu de Löwenstein et inoculés sous la peau de 4 cobayes. Ceux-ci, sacrifiés deux mois après l'inoculation, avaient des lésions généralisées aux organes.

L'ensemencement des organes a donné une culture à aspect lisse qui, réensemencée sur pomme de terre glycinée, s'est immédiatement transformée en culture rugueuse. Nous n'avons donc pas eu le temps d'inoculer la culture à son stade lisse.

Cette culture rugueuse ainsi obtenue a été inoculée au lapin, au cobaye et à la poule.

EXPÉRIENCE. — Le 6 mai 1932, 3 cobayes sont inoculés sous la peau avec 0 milligr. 01 de cette souche et 3 avec 1 milligramme.

Sacrifiés le 13 juin, les premiers présentent des lésions ganglionnaires caséuses, *de nombreux tubercules sur la rate, plus rares sur le foie et les poumons, les seconds des lésions généralisées à tous les organes.*

EXPÉRIENCE. — A la même date, 2 lapins reçoivent dans la veine 0 milligr. 01 de cette souche et 2 autres 1 milligramme. Sacrifiés le 15 juin, les premiers ne présentent aucune lésion, les seconds quatre ou cinq granulations sur les poumons.

EXPÉRIENCE. — 2 poules inoculées dans la veine avec cette souche le 6 mai 1932 et sacrifiées deux mois après n'ont aucune lésion et pas de bacilles dans leurs organes.

Si cette souche rugueuse, qui provenait de la souche lisse isolée d'un cobaye traité par l'extract acétonique et qui a repris momentanément l'aspect lisse après passage chez le lapin et le cobaye, était constituée par un mélange de bacilles aviaires et de bacilles humains, il semble que son inoculation à la poule et au lapin aurait donné des résultats différents.

b) *Souche lisse.*

D'autres expériences de passages chez les animaux ont été faites avec la souche B lisse.

EXPÉRIENCE. — Le 1^{er} octobre 1931, 2 lapins reçoivent dans la veine 10 milligrammes de cette souche.

Les 9 et 17 octobre suivants, ces deux animaux meurent avec une congestion intense du foie et de la rate, plus légère des poumons et des reins. Les bacilles y sont excessivement nombreux.

Les organes du dernier lapin sont broyés, dilués dans de l'eau physiologique et inoculés sous la peau de 2 cobayes et dans la veine de 2 lapins.

Les 2 cobayes meurent un mois après l'inoculation d'infections intercurrentes. Leurs ganglions inguinaux et sous-lombaires sont légèrement hypertrophiés et contiennent des bacilles. Leurs organes sont indemnes.

Un lapin meurt le 9 novembre avec ses organes hypertrophiés et congestionnés contenant un nombre énorme de bacilles, surtout le foie et la rate. Le deuxième lapin meurt le 20 novembre. Sa rate présente un semis de très fines granulations. Elle renferme un nombre énorme de *petits bacilles courts et fins*. Le foie en contient moins. Ils sont rares dans les poumons.

Les organes de ce dernier lapin sont broyés, traités par l'acide sulfurique, ensemencés sur le milieu de Löwenstein et inoculés le 20 novembre 1931 sous la peau de 4 cobayes.

L'ensemencement a donné une culture à aspect lisse qui s'est comportée par inoculation aux animaux comme la culture lisse originelle.

Les cobayes inoculés le 20 novembre avec les organes du dernier lapin sont sacrifiés le 15 février. Ils ne présentent que des abcès inguinaux contenant de nombreux bacilles et des ganglions sous-lombaires légèrement hypertrophiés renfermant de rares bacilles.

Dans ces expériences de passages par les animaux, la culture lisse a donc conservé les caractères qu'elle présentait au moment de son isolement.

ÉTUDE DES SOUCHES RUGUEUSE ET LISSE APRÈS SIX MOIS DE RÉENSEMENCEMENTS SUR POMME DE TERRE GLYCÉRINÉE.

Les propriétés pathogènes des souches rugueuse et lisse ont été de nouveau étudiées après six mois de réensemencements sur pomme de terre glycinée.

La souche lisse inoculée dans la veine du lapin à la dose de 10 milligrammes le tue toujours en dix-sept à vingt jours avec une hypertrophie et une congestion des organes qui contiennent de très nombreux bacilles de Koch dans le foie et la rate, moins nombreux dans les poumons.

A la dose de 1 milligramme dans la veine, un lapin meurt en trois semaines avec une congestion moins intense des organes et des bacilles moins nombreux, l'autre survit deux mois à l'inoculation et ne présente que quelques granulations sur les poumons.

Quatre cobayes, inoculés sous la peau, 2 avec 1 milligramme et 2 avec 10 milligrammes, sont sacrifiés au bout de deux mois et ne présentent que des abcès ou des ganglions inguinaux hypertrophiés au point d'inoculation.

Deux poules sont inoculées dans la veine avec 1 milligramme et 10 milligrammes de cette souche. La première meurt vingt-

cinq jours après l'inoculation avec un semis de granulations sur la rate qui est très hypertrophiée. La seconde meurt en douze jours sans lésions granuliques avec des bacilles de Koch peu nombreux dans le foie et la rate.

La souche rugueuse a été de même, après six mois de réensemencements sur pomme de terre glycérinée, inoculée au lapin, au cobaye et à la poule.

Les lapins, inoculés dans la veine avec 1 et 10 milligrammes, présentent quelques rares granulations sur les poumons avec de rares bacilles tuberculeux.

Les cobayes, inoculés sous la peau avec les mêmes doses, ont, au bout de deux mois, des lésions ganglionnaires caséuses et des tubercules sur la rate.

Deux poules, inoculées dans la veine avec 1 et 10 milligrammes, ne présentent, trois mois après l'inoculation, aucune lésion et pas de bacilles tuberculeux dans leurs organes.

ÉTUDE DE LA SOUCHE LISSE AYANT REPRIS L'ASPECT RUGUEUX APRÈS SEPT MOIS DE RÉENSEMENCEMENTS.

Après sept mois de réensemencements sur pomme de terre glycérinée, un tube de la souche lisse, dont l'aspect se modifiait, a repris en trois repiquages successifs l'aspect rugueux. En même temps elle a donné un voile sur bouillon glycérimé alors que les autres tubes restés lisses continuaient à troubler le bouillon dans sa profondeur.

Nous étant rendu compte qu'au même moment les souches restées lisses et rugueuses conservaient sensiblement les propriétés pathogènes qu'elles avaient montrées à l'origine, nous avons étudié les caractères d'inoculation aux animaux de la souche lisse devenue spontanément rugueuse dans les milieux de culture après six mois de réensemencements.

EXPÉRIENCE. — 4 cobayes reçoivent sous la peau, deux 1 milligramme de cette souche, deux 10 milligrammes le 11 février 1932. Sacrifiés le 9 avril suivant, ils ne présentent que des lésions ganglionnaires caséuses avec un abcès au point d'inoculation. Pas de lésions des organes.

EXPÉRIENCE. — 4 lapins reçoivent à la même date, deux 10 milligrammes de cette souche, et deux 1 milligramme. Les deux premiers meurent seize et dix-huit jours après l'inoculation avec des organes légèrement congestionnés conte-

nant de rares bacilles tuberculeux; les deux autres sont sacrifiés le 9 avril suivant. Leurs organes ne présentent aucune lésion et ne contiennent pas de bacilles.

Une poule inoculée dans la veine avec 1 milligramme de cette souche et sacrifiée deux mois après l'inoculation ne présente aucune lésion.

Après sept mois de réensemencements sur les milieux de culture, la souche lisse, qui a pris l'aspect rugueux, se comporte chez le lapin et la poule comme la souche rugueuse. Elle reste cependant légèrement toxique pour le lapin et peu pathogène pour le cobaye.

ÉTUDE DES SOUCHES LISSE ET RUGUEUSE

APRÈS QUINZE MOIS ET VINGT-DEUX MOIS DE RÉENSEMENCEMENTS.

Après quinze mois de réensemencements, la souche lisse inoculée dans la veine du lapin à la dose de 0 millig. 01 et 1 milligramme donne à cet animal quelques granulations disséminées sur les organes avec présence de rares bacilles. Elle n'a donc plus pour cet animal la toxicité qu'elle présentait auparavant. Les cobayes inoculés avec 0 milligr. 01 et 1 milligramme de cette souche, sacrifiés deux mois après l'inoculation, n'ont aucune lésion. Une poule inoculée dans la veine avec 5 milligrammes meurt au bout de six semaines avec quelques granulations sur le foie et la rate qui contiennent de nombreux bacilles.

La souche rugueuse, qui a subi le même nombre de réensemencements, ne donne pas de lésions au lapin par inoculation intraveineuse de 1 milligramme et détermine, chez le cobaye, l'apparition, deux mois après l'inoculation, de lésions ganglionnaires et spléniques.

Après vingt-deux mois de réensemencements, les lapins inoculés dans la veine avec 1 milligramme de la souche lisse sont encore vivants deux mois après l'inoculation. Sacrifiés à ce moment, leurs organes sont normaux à part, dans certains cas, une hypertrophie et congestion légères de la rate. On n'y trouve pas de bacilles acido-résistants. Cependant, Birkhaug a pu en mettre en évidence dans la moelle osseuse. Les cobayes, inoculés sous la peau avec 1 milligramme de la souche lisse, ne présentent aucune lésion au bout de deux mois. De même les poules inoculées avec la même dose dans la veine.

Les lapins, qui ont reçu dans la veine 1 milligramme de la souche rugueuse soumise au même nombre de réensemence-

ments, ont, deux mois après l'inoculation, des organes normaux sans bacilles. Cependant, la rate présente des cicatrices. Après le même délai, on ne constate aucune lésion chez les cobayes inoculés sous la peau avec 1 milligramme de la même souche.

CONCLUSIONS.

Ce qui nous a tout d'abord frappés, c'est qu'un même germe puisse, suivant l'aspect des colonies, avoir des caractères morphologiques et pathogènes si différents.

Les bacilles des colonies lisses sont de petits coccobacilles acido-résistants. Ceux des colonies rugueuses sont longs et fins comme les bacilles tuberculeux d'origine humaine.

Les bacilles des colonies lisses ont une teneur en matières grasses beaucoup plus élevée que les bacilles des colonies rugueuses. D'après les dosages que M. Bonnefoi a bien voulu faire au laboratoire de M. Machebœuf et dont nous le remercions, le rapport $\frac{\text{extrait lipoidique}}{\text{fraction alcool-coagulable}}$ est de 1,46 pour les cultures lisses et de 0,35 pour les cultures rugueuses.

Les premières acidifient le milieu de culture, les secondes l'alcalinisent.

Les bacilles des colonies lisses à forme coccobacillaire et très riches en matières grasses sont caractérisés par leur grande toxicité pour le lapin et la poule qui, inoculés par voie veineuse, meurent en quinze à trente jours suivant les doses (10 milligrammes à 0 milligr. 01), avec une pullulation énorme des bacilles dans leurs organes. Avec des doses de bacilles moins élevées, la survie de ces animaux est plus longue et les organes présentent un très grand nombre de fines granulations. Ces bacilles ne donnent au cobaye, par inoculation sous-cutanée, que des lésions ganglionnaires curables. Par inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale, les rats et les souris se sont montrés peu sensibles à ce germe.

Les bacilles des colonies rugueuses se sont comportés comme s'ils provenaient d'une souche d'origine humaine.

Après quinze mois de réensemencements, le pouvoir toxique de la souche lisse pour le lapin et la poule s'est atténué. A la même date, la souche rugueuse donnait encore au cobaye par

inoculation sous-cutanée des lésions ganglionnaires et spléniques.

Après vingt-deux mois de réensemencements, l'inoculation de 1 milligramme de la souche lisse au lapin et à la poule par la voie veineuse et de la même dose de la souche rugueuse au cobaye par la voie sous-cutanée, reste sans effets pour ces animaux.

Il n'est pas possible d'admettre que cette culture était composée d'un mélange de bacilles aviaires et de bacilles humains. Les caractères pathogènes des souches lisse et rugueuse ne seraient pas restés si tranchés au cours des réensemencements. On a, d'autre part, de la peine à concevoir, si cette dualité avait existé, que les pouvoirs pathogènes de ces deux souches différentes aient baissé parallèlement pour disparaître en même temps. La souche lisse se distingue d'un bacille aviaire en ce qu'elle acidifie le milieu de culture et la souche rugueuse se différencie d'un bacille de type humain en ce qu'elle l'alcalinise.

Les expériences que nous avons effectuées montrent qu'aussi bien dans les milieux artificiels que dans l'organisme des animaux inoculés, la souche lisse peut se transformer en souche rugueuse et réciproquement.

Nous concluons donc qu'il s'agit d'un bacille qui s'est présenté au moment de son isolement avec les caractères d'un bacille aviaire, mais qui est capable de donner des colonies rugueuses dont les bacilles se comportent au point de vue de leur pouvoir pathogène comme un bacille de type humain.

Comme nous l'avons déjà exposé avec F. Van Deinse, nous inclinons à penser (surtout après les expériences si intéressantes de ce dernier expérimentateur avec l'un de nous chez les cobayes inoculés avec un filtrat sur bougie Chamberland L₂ de bacilles bovins et traités par des injections d'extrait acétonique) que nous obtenons, grâce à cette méthode, le virus tuberculeux à un stade où son adaptation à telle ou telle espèce animale sensible n'est pas achevée et où il n'est pas encore définitivement fixé dans l'un de ces trois types humain, bovin et aviaire. Les constatations faites récemment par Ninni et Bretey et par Birkhaug, semblent en faveur de cette hypothèse.

BIBLIOGRAPHIE

- J. BEERENS. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **110**, 25 juin 1932, p. 682, et **113**, 16 juin 1933, p. 696.
- K. E. BIRKHAUG. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **113**, 24 juin 1933, p. 696.
- A. BOQUET et L. NÈGRE. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, 3 mars 1925.
- F. VAN DEINSE. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **107**, 4 juillet 1931, p. 1058 et **108**, 7 novembre 1931, p. 669.
- L. NÈGRE et A. BOQUET. *Le traitement de la tuberculose par l'antigène méthylé*. Masson et C^e, éditeurs, Paris, 1932.
- L. NÈGRE et J. VALTIS. *Ces Annales*, **46**, juin 1931, p. 587.
- L. NÈGRE, J. VALTIS et A. SAENZ. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **107**, 27 juin 1931, p. 942.
- L. NÈGRE, J. VALTIS et Guy LAROCHE. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **108**, 24 octobre 1931, p. 482.
- L. NÈGRE, J. VALTIS, F. VAN DEINSE et J. BEERENS. *La Presse Médicale*, n° 103, 24 décembre 1932.
- L. NÈGRE, J. VALTIS et F. VAN DEINSE. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **112**, 14 janvier 1933, p. 122.
- C. NINNI et J. BRETEY. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **113**, 24 juin 1933, p. 726.
- J. VALTIS et F. VAN DEINSE. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **111**, 22 octobre 1932.

DE L'ACTION DU SANG NORMAL SUR LA LYSE TRANSMISSIBLE DU STAPHYLOCOQUE DORÉ

par WILLY MUTSAARS (de Bruxelles).

En 1921, Gratia et Jaumain [1], au cours de recherches sur la neutralisation spécifique des principes lytiques, dits bactériophages du staphylocoque et du *B. coli* par les antisérums correspondants, ont observé que le sérum normal exerce sur la lyse du staphylocoque une inhibition très intense qu'il n'exerce pas sur la lyse du *B. coli*.

Nous avons repris l'étude de ce phénomène qui entre temps a été confirmé par M. Applebaum et W. J. Mac Neal [2] ainsi que par R. Biglieri et A. Fisher [3].

Voici l'expérience type telle qu'elle a été réalisée par Gratia et Jaumain :

On ensemence trois tubes de bouillon avec 1 goutte d'une jeune culture de staphylocoque doré H. On ajoute au deuxième et au troisième tube, 1 goutte de bactériophage staphylococcique polyvalent B. H. ; enfin, au troisième tube, X gouttes de sérum de lapin ou d'homme normal. On place les trois tubes à 37° et après douze heures, on constate que le deuxième tube qui contient du staphylocoque et du bactériophage, est entièrement limpide, tandis que le troisième qui contient en outre le sérum normal, est aussi trouble que le premier qui ne contient que la culture témoin de staphylocoque doré H. Toutefois, après vingt-quatre heures, le troisième tube se clarifie à son tour et devient aussi limpide que le deuxième.

ACTION DU SÉRUM NORMAL SUR DES DILUTIONS CROISSANTES DU PRINCIPE POLYVALENT B. H.

Au cours de recherches préliminaires en collaboration avec Gratia [4], nous avons commencé par refaire la même expérience en faisant agir le sérum normal sur des dilutions croissantes de bactériophage :

❖ EXPÉRIENCE I. — Faisons deux titrages parallèles du bactériophage B. H., en procédant à deux séries de dilutions de dix en dix fois plus grandes dans des

cation finit par s'étendre aussi loin que dans la série témoin, même jusqu'au huitième tube où pourtant une trace infinitésimale seulement de bactériophage a été au contact de grosses quantités de sérum. Il ne paraît donc pas y avoir d'atteinte quantitative directe du bactériophage par le sérum normal.

En conclusion, le sérum normal exerce une inhibition intense mais passagère. Il ne porte pas atteinte à l'intégrité du bactériophage, il n'a sur lui aucune action neutralisante. C'est d'ailleurs ce que l'expérience suivante confirme :

EXPÉRIENCE II. — On conserve pendant un mois en tube scellé à la température du laboratoire, un mélange en parties égales de bactériophage B. H. et de sérum, ainsi qu'un mélange témoin où le sérum est remplacé par du bouillon ordinaire. Après ce mois de contact, on soumet les deux mélanges à un titrage par la méthode des dilutions successives. Le résultat final des deux titrages est identique. Il n'y a eu aucune neutralisation.

ACTION DU SÉRUM NORMAL SUR LE PRINCIPE MONOVALENT B. L. S.

On sait que Gratia distingue [5] deux groupes de bactériophages staphylococciques : les principes polyvalents, tels que le B. H., et les principes monovalents, tels que le B. L. S. qui n'agit que sur quelques staphylocoques blancs. Or, le sérum normal qui inhibe si nettement l'action des bactériophages du premier groupe est sans effet sur ceux du second groupe ainsi qu'on le vérifie dans l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE III. — Même expérience que l'expérience I; mais en remplaçant le bactériophage BH par le bactériophage B. L. S. et le staphylocoque doré H.; par le staphylocoque blanc V;

On ne constate cette fois aucune différence entre les deux séries de tubes. Le sérum normal n'exerce aucune inhibition même sur la plus forte dilution de bactériophage B. L. S.

ACTION DU SÉRUM NORMAL SUR LA LYSE DU STAPHYLOCOQUE BLANC V. PAR LE PRINCIPE POLYVALENT B. H.

On croirait donc pouvoir déduire de l'expérience III que le sérum normal n'exerce son pouvoir inhibiteur que sur l'action des principes polyvalents. Mais dans l'expérience III, nous avons modifié deux facteurs à la fois : le bactériophage et le

microbe, nécessairement d'ailleurs, puisque le principe B. L. S. n'agit pas sur le staphylocoque doré H. Comme par contre, le principe polyvalent B. H. peut lyser aussi facilement le staphylocoque blanc V. que le doré H., profitons-en pour voir quelle est l'influence du sérum normal sur la lyse du staphylocoque blanc V. par le principe polyvalent.

EXPÉRIENCE IV. — Refaisons encore les deux séries de titrage de l'expérience I à l'aide du principe B. H.; mais en remplaçant le staphylocoque doré H. par le staphylocoque blanc V.

Cette fois, le résultat, contrairement à celui de l'expérience III, est identique dans les deux séries de tubes, celle avec sérum comme celle sans sérum.

L'action inhibitrice du sérum normal si intense sur la lyse par le principe polyvalent B. H., du staphylocoque doré H. ou de tout autre staphylocoque doré d'ailleurs, disparaît complètement dès qu'on remplace le staphylocoque doré par le staphylocoque blanc V., exactement comme pour la lyse du même staphylocoque blanc V par le principe monovalent B. L. S. Le sérum normal n'agit donc nullement sur le bactériophage; mais bien sur le microbe. C'est une action spécifique du sérum sur les staphylocoques dorés.

ACTION DU SÉRUM NORMAL SUR LA RÉGÉNÉRESCENCE DU PRINCIPE LYTIQUE.

En quoi consiste l'action inhibitrice du sérum normal sur la lyse des staphylocoques dorés? Se manifeste-t-elle sur la dissolution même du microbe ou sur la régénérescence du bactériophage aux dépens du microbe, le retard de la lyse étant alors une conséquence du retard de la régénérescence?

Divers auteurs, en effet, Doerr et Grüninger notamment [6], ont montré que la régénérescence du bactériophage ne coïncide pas avec la lyse; mais la précède. C'est ainsi que Gratia et de Kruif [7], au cours d'expériences établissant quel'activité de la substance lytique n'est pas fonction de sa concentration relative, mais bien de sa quantité absolue, ont observé la lyse dans des ballons de 1 litre où le principe se trouvait à la dilution extrême de 10^{-10} et même de 10^{-11} . Cette lyse était alors très tardive et ne s'amorçait que vers le huitième jour, mais ces

TABLEAU III. — Régénérescence du principe BH en l'absence du sérum.

	PRÉLÈVEMENTS FAITS APRÈS							
	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	5 heures	6 heures	7 heures	8 heures
10 - 1	---	---	---	---	---	---	---	---
10 - 2	---	---	---	---	---	---	---	---
10 - 3	---	---	---	---	---	---	---	---
10 - 4	---	---	---	---	---	---	---	---
10 - 5	+++	---	---	---	---	---	---	---
10 - 6	+++	+++	---	---	---	---	---	---
10 - 7	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---
10 - 8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---

TABLEAU IV. — Régénérescence du principe BH en présence du sérum.

	PRÉLÈVEMENTS FAITS APRÈS										
	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	5 heures	6 heures	7 heures	8 heures	16 heures	17 heures	21 heures
10 - 1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10 - 2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10 - 3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10 - 4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10 - 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---
10 - 6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
10 - 7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
10 - 8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---

auteurs constataient que le bactériophage s'était déjà complètement régénéré dès le premier jour [5]. Il peut donc y avoir régénérescence totale du principe lytique alors que la lyse est encore loin d'être décelable. Les deux phénomènes, celui de la lyse et celui de la régénérescence du principe lytique étant distincts, il y a donc lieu de rechercher sur lequel des deux l'action inhibitrice du sérum normal se manifeste. L'expérience suivante va nous permettre de trancher la question :

EXPÉRIENCE V. — On ensemence avec le staphylocoque H. du bouillon contenant du bactériophage B. H. à la concentration de 10^{-3} . On répartit également le mélange entre deux récipients et on ajoute à l'un d'eux 10 p. 100 de

sérum normal. On suit comparativement la régénérescence du bactériophage dans les deux récipients en faisant des titrages toutes les heures. Voici les résultats consignés dans les tableaux III et IV.

En l'absence de sérum, le principe commence déjà à se régénérer vers la deuxième heure et atteint son taux maximum après huit heures d'étuve à 37°. En présence de sérum, au contraire, le principe ne commence à se régénérer qu'à partir de la dix-septième heure et atteint alors rapidement son taux maximum vers la vingt et unième heure. Or, à ce moment, il n'y a dans ce ballon aucun signe de lyse. Conclusion : le sérum retarde de façon évidente la régénérescence du bactériophage ; de plus, il se vérifie que celui-ci est complètement régénéré bien avant que la dissolution microbienne se soit opérée.

ACTION DU SÉRUM NORMAL A DIFFÉRENTES DILUTIONS.

Il va de soi que l'action du sérum est d'autant plus intense que sa concentration est plus forte. Il agit toutefois encore à des doses relativement faibles.

EXPÉRIENCE VI. — A une série de tubes contenant tous du principe B. H. à la concentration 10^{-4} , on ajoute du sérum normal à des dilutions croissantes : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Un cinquième tube de principe à 10^{-4} n'est pas additionné de sérum. On ensemence les 5 tubes ainsi qu'un tube de bouillon ordinaire avec le staphylocoque H. Après six heures, puis vingt-quatre heures d'étuve à 37°, on lit les résultats suivants :

	APRÈS 6 HEURES à 37°	APRÈS 24 HEURES à 37°
H	+++	+++
H + BH 10^{-4}	---	---
H + BH 10^{-4} + Sérum 10^{-1} . . .	+++	+++
H + BH 10^{-4} + Sérum 10^{-2} . . .	+++	+ --
H + BH 10^{-4} + Sérum 10^{-3} . . .	++ -	-- --
H + BH 10^{-4} + Sérum 10^{-4} . . .	---	---

Après six heures, il y a donc inhibition complète des tubes où le sérum est à la dilution de 10^{-1} et de 10^{-2} et inhibition partielle, c'est-à-dire début de lyse dans le tube contenant le sérum à 10^{-3} . Après vingt-quatre heures, l'inhibition est encore visible pour la dilution de 10^{-2} et complète pour la dilution de 10^{-1} .

On sait que Doerr [8], Doerr et Berger [9], Nakamura [10], Brutsaert [11] ont étudié la lyse dans différents milieux gommeux et surtout gélatinés. Pour Hauduroy [12], le retard de la lyse en gélatine serait uniquement dû à une augmentation de la viscosité. On ne pourrait invoquer une telle cause pour le cas du sérum normal puisque celui-ci manifeste encore une action inhibitrice nette à la dilution de 10^{-3} à laquelle il est peu vraisemblable que le sérum modifie la viscosité du milieu. On sait d'ailleurs que son influence ne s'exerce pas sur tous les staphylocoques.

DISPARITION DE L'INHIBITION.

Nous avons vu que la protection exercée par le sérum normal n'est pas absolue : après dix-sept heures environ, le principe lytique commence à se régénérer et, finalement, après quarante-huit heures environ, selon la teneur initiale en principe, la clarification s'opère aussi complète que dans les tubes sans sérum. A quoi est due cette disparition du pouvoir inhibiteur du sérum? Nous nous sommes demandé si le staphylocoque H. qui pousse donc abondamment pendant ces dix-sept heures, ne détruisait pas ou n'altérait pas de quelque façon la substance inhibitrice. Pour le savoir, faisons l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE VII. — On ensemence avec du staphylocoque H. et place à 37° deux ballons de 250 cent. cubes de bouillon dont l'un contient, en outre, 25 cent. cubes de sérum normal de lapin. Après successivement deux, quatre, six, huit, dix-sept et vingt-quatre heures d'étuve, on prélève 15 à 20 cent. cubes de chacune des deux cultures et les filtre sur bougie Chamberland L3. L'on obtient ainsi des filtrats de cultures où le staphylocoque a poussé pendant des temps croissants soit dans du bouillon ordinaire, soit dans du bouillon contenant 10 p. 100 de sérum. Avec ces filtrats, on fait trois séries de tubes :

La série A contient, à raison de 5 cent. cubes par tube, les filtrats où le staphylocoque H. a poussé en bouillon ordinaire pendant des temps croissants.

La série B contient les mêmes filtrats à raison de 4 c. c. 5 par tube, et on ajoute à chaque tube 0 c. c. 5 de sérum normal de lapin.

La série C contient, à raison de 5 cent. cubes par tube, les filtrats où le staphylocoque a poussé pendant des temps croissants en présence du sérum normal.

A chacun des tubes des trois séries, on ajoute du BH à la concentration de 10^{-4} , puis 1 goutte d'une jeune culture en bouillon de staphylocoque H. Dans la série A, qui ne contient pas de sérum, la lyse ne doit pas être

inhibée; dans la série B, qui contient du sérum frais, la lyse doit être inhibée; dans la série C, enfin, qui contient du sérum dans lequel le staphylocoque aura poussé pendant des temps croissants, il y aura inhibition ou non selon que la culture n'aura pas ou aura altéré l'agent inhibiteur du sérum. Voici les résultats après vingt-quatre heures d'étuve à 37° :

TABLEAU V.

	2 HEURES	4 HEURES	6 HEURES	8 HEURES	17 HEURES	24 HEURES	48 HEURES
Série A	---	---	---	---	---	---	---
Série B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
Série C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---

Nous constatons donc que la culture du staphylocoque H. n'a en rien altéré les propriétés inhibitrices du sérum normal. La raison de la disparition du pouvoir inhibiteur après dix-sept heures environ, nous échappe encore.

ESSAIS D'ACCOUSTOMANCE.

De nombreux essais ont été tentés par différents auteurs pour accoutumer le principe lytique à des substances chimiques ou à des agents physiques antagonistes du bactériophage. Nous avons voulu voir si l'on pouvait adapter le principe B. H. à l'action inhibitrice du sérum normal.

EXPÉRIENCE VIII. — Nous avons fait dix passages du principe B. H. dans du bouillon contenant 10 p. 100 de sérum normal, en filtrant chaque fois que la lyse était complète et en retransportant ensuite après dilution convenable, le principe dans un nouveau tube de bouillon-sérum. Après dix passages, le B. H. ainsi obtenu est comparé au B. H. ordinaire. L'inhibition exercée par le sérum reste également longue et intense pour les deux principes. En bouillon ordinaire, il n'y a d'ailleurs aucune différence non plus entre les deux échantillons de B. H.

Nous ne constatons donc aucune accoutumance. Mais, en vérité, le sérum n'exerçant, comme nous l'avons vu plus haut, aucune action directe sur le principe, il n'est pas étonnant que les essais d'accoutumance du principe au sérum normal ait échoué.

Puisque l'action du sérum se porte en réalité sur le staphylocoque, nous nous sommes demandé si on ne pourrait pas

plutôt accoutumer le staphylocoque doré à l'action du sérum ; mais le résultat de l'expérience fut également négatif :

EXPÉRIENCE IX. — Vingt passages du staphylocoque doré H. dans du bouillon contenant 10 p. 100 de sérum normal ou même dans du sérum normal pur, n'ont pas modifié son comportement envers le bactériophage B. H., en présence comme en absence de sérum : en bouillon ordinaire, il est lysé aussi rapidement que le staphylocoque cultivé en bouillon simple ; sa lyse est inhibée de façon identique dans du bouillon-sérum.

INFLUENCE DU PLASMA NORMAL SUR LA LYSE DU STAPHYLOCOQUE DORÉ.

Le pouvoir inhibiteur du sérum sanguin se trouve aussi dans le plasma normal oxalaté. Ce plasma, pas plus que le sérum, ne neutralise le bactériophage ; et si l'on titre des mélanges parties égales de plasma et de principe lytique, ou d'eau physiologique et de principe, mélanges abandonnés à l'étuve pendant vingt-quatre ou quarante-huit heures, on observe que le taux d'activité des deux mélanges est le même (titrage par la méthode des dilutions successives). Si l'on veut observer la lyse en bouillon-plasma, comme nous l'avons fait pour le bouillon-sérum, l'expérience se complique par la présence du fibrinogène qui, sous l'influence des staphylocoques, se coagule et emprisonne dans son réseau une certaine quantité de microbes qui échappent ainsi momentanément à la lyse. Ultérieurement, l'influence protéolytique des staphylocoques se fait sentir, le caillot se dissout et le liquide se clarifie parfaitement.

INFLUENCE DU LIQUIDE D'ASCITE ET DU LIQUIDE PLEURAL SUR LA LYSE DU STAPHYLOCOQUE H.

Nous avons recherché si le même pouvoir inhibiteur se retrouvait dans certains liquides d'origine pathologique. C'est ainsi que nous avons utilisé d'une part du liquide d'ascite, d'autre part un exsudat pleural (teneur en albumine : 34 gr. 7 p. 100).

EXPÉRIENCE X. — On dilue du principe B. H. de 10^{-1} à 10^{-6} en quatre séries parallèles. On ajoute à la première série témoin X gouttes d'eau physiologique dans chaque tube ; à la deuxième série, X gouttes de sérum humain normal ; à la troisième série, X gouttes de liquide d'ascite ; à la quatrième série, X gouttes de liquide pleural. Onensemence chaque tube avec 1 goutte de culture H. Voici l'état des tubes après six heures d'étuve.

TABLEAU VI.

	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6
Témoin (E. P.)	---	---	---	+++	+++	+++
Sérum	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ascite	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Liquide pleural	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Ultérieurement d'ailleurs (quarante-huit heures d'étuve), la lyse se fera dans les tubes contenant les liquides organiques comme dans la série témoin.

Si nous utilisons un liquide organique pauvre en matières protéiques, tel qu'un liquide céphalo-rachidien, nous observons que le pouvoir inhibiteur est réduit à presque rien.

INFLUENCE DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN SUR LA LYSE DU STAPHYLOCOQUE H.

EXPÉRIENCE XI. — Répétons l'expérience précédente avec une série témoins où chaque tube contient X gouttes d'eau physiologique, une seconde série témoin contenant X gouttes de sérum normal par tube, enfin une troisième série contenant X gouttes de liquide céphalo-rachidien normal par tube. Après six heures, on a :

TABLEAU VII.

	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6
Témoin (E. P.)	---	---	---	+++	+++	+++
Témoin (sérum N)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Liquide céphalo-rachidien	---	---	+	+++	+++	+++

Après vingt-quatre heures, on a :

TABLEAU VIII.

	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6
E. P.	---	---	---	---	---	---
Sérum N.	++-	++-	++-	++-	+++	+++
Liquide céphalo-rachidien	---	---	---	---	+	+

D'après ces expériences, on constate que le pouvoir inhibiteur des liquides organiques en général est lié à leur richesse en constituants albuminoïdes.

RÔLE DES ALBUMINOÏDES DU SÉRUM.

Nous avons voulu rechercher si ce pouvoir inhibiteur était dû à une fraction bien déterminée des matières protéiques du sérum sanguin.

EXPÉRIENCE XII. — On dilue du sérum normal au 1/10, en y ajoutant de l'eau distillée. On y fait ensuite passer un courant d'acide carbonique. Le précipité constitué surtout d'euglobulines est recueilli après centrifugation et après lavage par de l'eau distillée, il est remis en solution en E. P. de façon à atteindre le même volume que le liquide surnageant, lequel est d'ailleurs encore soumis à un nouveau passage de CO^2 et à une nouvelle centrifugation, afin d'éliminer toute trace d'euglobuline qui aurait pu échapper à la première précipitation.

On prépare quatre séries de dilutions du principe B. H. de 10^{-1} à 10^{-6} . On ajoute à la première 1 cent. cube de sérum dilué au 1/10 dans chaque tube (série témoin) ; à la deuxième série, 1 cent. cube de la fraction albumines ; à la troisième série, 1 cent. cube de la fraction globulines ; à la quatrième série, qui est une série témoin, 1 cent. cube d'E. P. dans chaque tube.

On ensemence avec 1 goutte de staphylocoque H. Après trois heures d'étuve, on a :

TABLEAU IX.

	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6
Sérum complet	+ - -	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -
Albumines	+ - -	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -
Globulines	- - -	± - -	++ -	++ -	++ -	++ -
E. P. (témoin)	- - -	- - -	++ -	++ -	++ -	++ -

Les inhibitions constatées au cours de ces expériences, faites avec les liquides au 1/10 sont évidemment moins intenses que celles observées avec du sérum non dilué. Toutefois, il résulte de cet essai que le pouvoir inhibiteur du sérum doit être attribué à sa fraction hydrosoluble, l'albumine.

En effet, le sérum privé des globulines exerce un pouvoir inhibiteur tout aussi intense que le sérum normal à la même dilution, et les globulines resolubilisées en eau physiologique n'exercent pratiquement aucun effet sur la lyse.

INFLUENCE DU SÉRUM SUR LA FIXATION DU PRINCIPES B. H.
SUR LE STAPHYLOCOQUE DORÉ H.

On n'ignore pas le rôle important que joue la fixation dans le phénomène de la lyse transmissible dont elle semble être la première étape. D'Hérelle [13] montre la fixation spécifique du principe anti-Shiga sur le bacille correspondant, le même principe ne se fixant pas sur le vibron cholérique. Gratia [14] montre également que du principe lytique, mis en présence d'une grande quantité de microbes, voit son action diminuer par une sorte de phénomène de fixation. Jaumain et Meuleman [15], Costa Cruz [16] montrèrent qu'il y a fixation sur les microbes tués par la chaleur.

Que constaterons-nous si nous étudions comparativement la fixation du principe B. H. sur le staphylocoque II en bouillon ordinaire et en bouillon + sérum ?

EXPÉRIENCE XIII — On répartit du principe à la dilution 10^{-1} dans trois tubes à raison de 4 c. c. 5 par tube. Aux deux premiers tubes, on ajoute X gouttes de bouillon ordinaire; au troisième tube, X gouttes de sérum normal de lapin. On agite de façon à homogénéiser les mélanges, ensuite on ajoute aux deux derniers tubes, IV gouttes d'une suspension épaisse de staphylocoque doré H., suspension obtenue en reprenant par 1 cent. cube d'eau physiologique une culture en nappe sur gélose inclinée, âgée de vingt-quatre heures. On agite et on laisse vingt minutes à l'éluve. On centrifuge ensuite les deux tubes additionnés de microbes, puis on titre les liquides surnageants ainsi que le liquide du tube témoin (sans microbes).

TABLEAU X.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
BH normal.	---	---	---	---	---	---	---	+++
BH traité par staphylocoque	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++
BH traité par staphylocoque en présence de sérum normal.	---	---	---	---	---	---	+++	+++

La substance lytique a subi une fixation bien moins considérable dans le tube contenant X gouttes de sérum que dans le tube ne contenant que du bouillon.

INFLUENCE DU SÉRUM SUR LA FIXATION DU PRINCIPE B. H.
PAR LE STAPHYLOCOQUE BLANC V.

Nous avons vu que la souche de staphylocoque blanc V, également sensible au principe B. H., n'est nullement protégée par le sérum contre la lyse. Verrons-nous de même que le sérum normal n'empêche pas la fixation du principe sur ce microbe? Pour cela, il suffit de répéter l'expérience XIII en remplaçant la suspension épaisse de staphylocoque doré H. par une suspension de V.

EXPÉRIENCE XIV. — On dilue du principe B. H. à 10^{-1} ; on le répartit en deux tubes (4 c. c. 5 par tube); on ajoute IX gouttes de sérum normal à l'un des tubes, IX gouttes de bouillon ordinaire à l'autre. On titre ces deux tubes avant l'addition des microbes.

TABLEAU XI.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
BH 10^{-1} + Sérum. . .	---	---	---	---	---	---	---	+++
BH 10^{-1} + Bouillon ordinaire.	---	---	---	---	---	---	---	+++

Ensuite, on ajoute à chacun des tubes IV gouttes d'une suspension de staphylocoque V. On laisse à l'étuve pendant vingt minutes et on centrifuge. On titre le liquide surnageant.

Après addition de staphylocoque V :

TABLEAU XII.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
BH 10^{-1} + Sérum. . .	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++
BH 10^{-1} + Bouillon ordinaire.	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++

La fixation du principe sur la souche V. se fait donc tout aussi bien en présence qu'en l'absence de sérum. Il y a donc tout lieu de croire que si le sérum normal inhibe l'action du bactériophage sur les staphylocoques dorés, c'est qu'il protège ceux-ci contre la fixation du principe lytique.

INFLUENCE DES ALBUMINES ET DES GLOBULINES DU SÉRUM
SUR LA FIXATION DU PRINCIPE B. H. SUR LE STAPHYLOCOQUE DORÉ II.

Nous avons vu que la fraction euglobulines du sérum n'inhibait pas la lyse du staphylocoque H. par le principe B. H., le pouvoir inhibiteur étant localisé dans la fraction albumine. (Exp. XII).

Nous avons voulu rechercher quelle était l'influence de ces deux fractions sur la fixation du principe sur le staphylocoque H.

EXPÉRIENCE XV. — Nous utilisons pour cela les mêmes liquides que dans l'expérience XII, c'est-à-dire : 1° une fraction euglobulines résolubilisée dans de l'E. P.; 2° la fraction albumines correspondante; 3° du sérum normal. Ces trois produits sont tous dilués au 1/10; nous recueillons 4 c. c. 5 de chacun d'eux dans les tubes 1, 2, 3; nous préparons également deux tubes, 4 et 5, contenant chacun 4 c. c. 5 d'E. P. Nous ajoutons à ces cinq tubes 1 goutte de principe B. H. actif, puis en outre aux quatre premiers tubes, V gouttes d'une suspension de staphylocoque H. Tous les tubes sont placés à l'étuve pendant vingt minutes; ensuite, nous centrifugeons les quatre premiers tubes et titrons leurs liquides surnageants, ainsi que le liquide du tube 5.

TABLEAU XIII. — V gouttes suspension staphylocoques H.

	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6	10 - 7
Tube 1. Sérum 1/10 .	---	---	---	---	---	---	---
Tube 2. Albumine 1/10 .	---	---	---	---	---	---	---
Tube 3. Globuline 1/10 .	---	---	---	---	---	+++	+++
Tube 4. E. P.	---	---	---	---	---	+++	+++
Tube 5. E. P. Témoin sans staphylocoque H . .	---	---	---	---	---	---	---

La fixation du principe B. H. s'est faite en présence des globulines comme dans le tube ne contenant que de l'E. P.; par contre, la fraction albumine du sérum a empêché la fixation tout aussi bien que le sérum complet.

Ces résultats confirment l'opinion que le sérum inhibe la lyse des staphylocoques dorés en les protégeant contre la fixation du bactériophage.

ACTION DES LEUCOCYTES SUR LE PRINCIPE B. H.

L'influence des éléments figurés du sang sur le bactériophage a été signalée il y a longtemps déjà par Bruynoghe et Maisin (17) qui, ayant ajouté du bactériophage à du pus, voient son titre diminuer considérablement après vingt-quatre heures à 37°. Par contre, les leucocytes morts (pus tuberculeux et pus vieilli) étaient sans influence. Eliava a (18) étudié *in vivo* la fixation du bactériophage par les leucocytes. Ces auteurs sont d'accord pour noter que le sang (globules rouges) ne fixe pas le principe. O. G. Bier et P. Cunha Nobrega (19) nient l'absorption du bactériophage par les leucocytes. Ils mettent du principe au contact de sang oxalaté de cheval. Après vingt-quatre heures, ils centrifugent le sang et décantent le plasma surnageant. Celui-ci a conservé intact sa teneur en principe. Cette expérience répétée avec du sang total a donné le même résultat négatif; elle ne paraît pas suffisamment concluante pour permettre de nier l'absorption du principe par les leucocytes. *In vivo*, ces auteurs ont constaté qu'une heure après une injection intraveineuse de principe, on pouvait prélever du sang dont le sérum contenait le bactériophage en quantité non diminuée, les leucocytes et hématies du sang après lavage avec de l'E. P. n'en contenant pas. Ici, ils sont en contradiction avec Eliava qui, deux heures après l'injection, ne retrouve plus de principe.

Nous avons vérifié que les leucocytes fixaient parfaitement le principe B. H., ainsi que le montre l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE XVI. — Nous avons utilisé un exsudat péritonéal de cobaye provoqué par l'injection de 20 cent. cubes de bouillon ordinaire dans la cavité péritonéale. Nous prélevons (après défibrination) 2 cent. cubes de cet exsudat riche en leucocytes. Nous y ajoutons 1 goutte de principe B. H. Nous centrifugeons une autre partie de l'exsudat et recueillons le liquide surnageant. Nous soumettons une troisième partie à une congélation suivie de décongélation; cette opération est répétée trois fois. Nous centrifugeons ensuite et recueillons le liquide surnageant. Nous établissons finalement la série de tubes suivante :

- 1° 2 cent. cubes exsudat complet + 1 goutte B. H.
- 2° 2 cent. cubes liquide surnageant exsudat + 1 goutte B. H.
- 3° 2 cent. cubes liquide surnageant d'exsudat congelé trois fois + 1 goutte B. H.

so 2 cent. cubes E. P. + 1 goutte B. H.

Ces tubes, laissés vingt-quatre heures à l'étuve, sont titrés après centrifugation du tube 1.

TABLEAU XIV.

	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6	10 - 7	10 - 8
1. Exsudat complet . .	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++
2. Liquide surnageant.	---	---	---	---	---	---	---	+++
3. Liquide surnageant.	---	---	---	---	---	---	---	---
Exsudat congelé . .	---	---	---	---	---	---	---	+++
4. E. P.	---	---	---	---	---	---	---	+++

Seul le tube renfermant des leucocytes a subi une diminution du taux du principe lytique. La congélation répétée de l'exsudat ne nous a pas permis d'obtenir un produit actif sur le principe.

Gengou (20) signale d'ailleurs que les différents procédés (congélation, macération, broyage) mis en œuvre pour extraire les substances bactéricides des leucocytes, s'ils ont permis d'obtenir des produits actifs sur certains microbes, n'ont jamais pu fournir un extrait capable de transformer par exemple le vibrion cholérique en granules, ainsi que le font les leucocytes au cours de la phagocytose. Par contre, la méthode d'extraction imaginée par Gengou donne des principes provoquant cette transformation.

La technique en est la suivante : un exsudat pleural citraté de lapin est lavé plusieurs fois au Ringer ; ensuite, on délaie les leucocytes dans un volume approprié de Ringer. On les recentrifuge et on les resuspend dans de l'acide chlorhydrique centinormal (deux fois le volume du liquide de Ringer précédent). On laisse à une température de 6 à 8° pendant une heure (le contact peut se prolonger pendant vingt-quatre à quarante-huit heures sans inconvénients). On neutralise ensuite exactement par de la soude centinormale. On centrifuge pour éliminer le précipité produit par cette neutralisation ; le liquide surnageant constitue l'extrait leucocytaire.

Grâce à cette technique nous avons obtenu un liquide dont nous avons vérifié l'activité bactériolytique en constatant la transformation en granules du vibrion cholérique au bout d'une heure à 37°.

EXPÉRIENCE XVII. — Nous avons ensuite étudié l'action de l'extrait sur le bactériophage B. H : un témoin était formé de 2 cent. cubes d'E. P. additionnés d'une goutte de B. H. Après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve on titre les deux tubes.

TABLEAU XV.

	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
Extrait leucocytaire.	---	---	---	---	---	+++	+++	+++
E. P.	---	---	---	---	---	---	---	+++

Indiscutablement, le bactériophage a subi une diminution notable de son activité. Cette action de l'extrait leucocytaire n'est d'ailleurs pas éteinte ; et si nous titrons les mêmes tubes qui ont été, après leur séjour à l'étuve, abandonnés à la température du laboratoire pendant trois jours, nous constatons que le titre du bactériophage a encore baissé.

Vingt-quatre heures étuve ; trois jours température ordinaire.

TABLEAU XVI.

	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
Extrait leucocytaire.	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++
E. P.	---	---	---	---	---	---	---	+++

On n'ignore pas que les principes lytiques en général sont sensibles à la réaction du milieu, et que l'acidité est fort nuisible à leur conservation. La technique d'extraction de Gengou nécessite une acidification suivie il est vrai d'une neutralisation par la soude. Nous avons vérifié que la réaction de notre extrait était neutre. On ne peut donc objecter que c'est l'acidité du milieu qui a influencé le titre du bactériophage.

EXPÉRIENCE XVIII. — Gengou signale qu'en milieu neutre son extrait est inactivé par un chauffage à 100° pendant quinze minutes. Nous avons soumis à ce traitement une partie de l'extrait. Nous avons ensuite introduit 2 cent. cubes de cet extrait chauffé dans un tube, nous avons ajouté 2 cent. cubes d'extrait actif à un deuxième tube et 2 cent. cubes d'E. P. à un troisième tube. A chaque tube nous avons ajouté 1 goutte de principe B. H. Après un séjour de vingt-quatre heures à 37° et de trois jours à la température du laboratoire nous avons titré les trois tubes :

TABLEAU XVII.

	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
Extrait leucocytaire.	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++
Extrait leucocytaire chauffé	---	---	---	---	---	---	---	+++
E. P.	---	---	---	---	---	---	---	+++

L'extrait inactivé par chauffage à 100° n'exerce plus d'action sur le bactériophage.

Gengou signale encore dans sa note que l'addition d'une quantité suffisante de vibrions cholériques permet d'épuiser l'action bactériolytique d'un extrait leucocytaire. Le même traitement ferait-il perdre en même temps à l'extrait son pouvoir destructeur du bactériophage?

EXPÉRIENCE XIX. — On prépare les tubes suivants :

I. 8 cent. cubes extrait leucocytaire + 2 cent. cubes suspension vibrions cholériques.

II. 8 cent. cubes extrait leucocytaire + 2 cent. cubes E. P.

III. 8 cent. cubes E. P. + 2 cent. cubes suspension vibrions cholériques.

Après deux heures de contact, on centrifuge les tubes I et III et on décante les liquides surnageants. On établit alors les trois tubes suivants :

I^a 2 cent. cubes liquide surnageant (extrait leucocytaire + vibrions cholériques).

II^a 2 cent. cubes extrait leucocytaire + E. P.

III^a 2 cent. cubes liquide surnageant (E. P. + vibrions cholériques).

On ajoute à chacun de ces tubes, 1 goutte de principe B. H. On scelle et laisse trois jours à l'étuve. On titre ensuite la teneur de chaque tube en principe lytique.

TABLEAU XVIII.

	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
I ^a	---	---	---	---	---	+++	+++	+++
II ^a	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
III ^a	---	---	---	---	---	---	---	+++

Un extrait leucocytaire épuisé par le contact avec des vibrions cholériques perd aussi la plus grande partie de son pouvoir destructeur pour le bactériophage B. H.

Signalons encore en passant que dans cette expérience, l'on

ne peut, pour éliminer les vibrions cholériques des extraits, remplacer la centrifugation par la filtration sur bougie Chamberland L3. Le simple passage, en effet, à travers la bougie enlève à l'extrait une grande partie de son pouvoir destructeur du bactériophage.

EXPÉRIENCE XX. — On ajoute 1 goutte de principe B. H. respectivement à 2 cent. cubes d'extrait leucocytaire et à 2 cent. cubes du même extrait filtré. Après trois jours à 37°, on titre l'activité lytique des deux mélanges :

TABLEAU XIX.

	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6	10 - 7	10 - 8
Extrait leucocytaire non filtré.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Extrait leucocytaire filtré.	---	---	---	---	---	+++	+++	+++

L'extrait leucocytaire préparé par la méthode de Gengou détruit le bactériophage staphylococcique B. H. Ce pouvoir destructeur de l'extrait leucocytaire disparaît après chauffage à 100° ; il est en majeure partie absorbé après traitement par une suspension de vibrions cholériques ou encore après filtration sur bougie Chamberland L3.

ACTION DES PLAQUETTES SUR LE PRINCIPE B. H.

EXPÉRIENCE. XXI. — On recueille du sang oxalaté de lapin. On le centrifuge à vitesse modérée pendant cinq minutes de façon à sédimenter les globules rouges et les leucocytes. On décante le plasma surnageant qui est franchement trouble. On le centrifuge cette fois de façon énergique et prolongée de façon à sédimenter les plaquettes. On décante les 9/10 du plasma limpide surnageant et remet en suspension le culot de plaquettes dans le 1/10 de plasma restant. A 2 cent. cubes de ce plasma enrichi en plaquettes on ajoute 1 goutte de principe B. H. ; on ajoute de même 1 goutte de B. H. à 2 cent. cubes d'E. P. Après vingt-quatre heures on centrifuge le premier mélange, puis on titre le contenu en bactériophage du liquide surnageant ainsi que celui du mélange témoin.

TABLEAU XX.

	10 - 1	10 - 2	10 - 3	10 - 4	10 - 5	10 - 6	10 - 7	10 - 8
BH + Plaquettes . .	---	---	---	---	---	---	---	+++
BH + E. P.	---	---	---	---	---	---	---	+++

Contrairement aux leucocytes, les plaquettes sanguines ne paraissent nullement fixer ou détruire le bactériophage B. H.

CONCLUSIONS.

1° Conformément aux observations de Gratia et Jaumain, le sérum normal d'homme ou d'autres animaux exerce une inhibition intense, mais temporaire sur la lyse du staphylocoque par le bactériophage. Cette inhibition n'affecte que la lyse des staphylocoques dorés et non celle des staphylocoques blancs. Elle est due non pas à une atteinte directe du bactériophage par quelque action neutralisante du sérum normal, mais bien à une protection exercée par la fraction albumines du sérum sur les staphylocoques dorés contre la fixation du principe lytique.

2° Conformément à l'observation de Bruynoghe et Maisin, les leucocytes fixent ou détruisent le bactériophage. Un extrait leucocytaire préparé selon la méthode de Gengou et capable de réduire les vibrions cholériques en granules, a la même action destructrice que les leucocytes sur le bactériophage. Il perd complètement cette action après chauffage à 100°; il la perd en grande partie après filtration sur bougie Chamberland L3 ou après adsorption par des émulsions de vibrions cholériques.

3° Les plaquettes sanguines paraissent n'avoir aucune action fixatrice ou destructrice sur le bactériophage du staphylocoque.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRATIA et JAUMAIN. *C. R. Soc. Biol.*, 85, 1921, p. 882.
- [2] APPLEBAUM et MAC NEAL. *Journ. of Inf. Dis.*, 49, 1931, p. 225.
- [3] BIGLIERI et FISCHER. *Folia Biologica*, Buenos-Ayres, n° 5, 1931.
- [4] GRATIA et MITSARS. *C. R. Soc. Biol.*, 106, 1931, p. 943.

- [5] GRATIA. *Ces Annales*, **46**, 1931, p. 622.
- [6] DOERR et GRUNINGER. *Zeitschr. f. Hyg. u. Inf.* **37**, 1922, p. 209.
- [7] GRATIA et DE KRUIF. *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 1923, p. 308.
- [8] DOERR. *Klin. Wochenschr.*, 1922, p. 1493.
- [9] DOERR et BERGER. *Zeitschr. f. Hyg. u. Inf.*, **97**, 1923, p. 422.
- [10] NAKAMURA. *Arch. f. Hyg.*, **92**, 1923, p. 64.
- [11] BRUTSAERT. *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 1924, p. 1292.
- [12] HAUDOUROY. *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 1924, p. 1463.
- [13] D'HERELLE. *Le Bactériophage dans l'Immunité*, 1921, p. 43.
- [14] GRATIA. *Journ. of Exper. Med.*, **34**, 1921, p. 115.
- [15] JAUMAIN et MAULEMAN. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 362.
- [16] DA COSTA CRUZ. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **14**, 1922, p. 81.
- [17] BRUYNOGHE et MAISIN. *C. R. Soc. Biol.*, **86**, 1922, p. 292.
- [18] ELIAVA. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, p. 829.
- [19] BIER et CUNHA NOBREGA. *C. R. Soc. Biol.*, **108**, 1931, p. 513.
- [20] GENGOU. *Ces Annales*, **35**, 1921, p. 497.

SUR LE MÉCANISME DE L'INFECTION COLIBACILLAIRE

par T. V. SIMITCH et St. MRCHEVITCH (de Belgrade).

Dans un article récemment publié (1), nous avons exposé les résultats de nos observations cliniques sur l'infection colibacillaire et nous avons donné un aperçu de nos recherches expérimentales alors en cours. Ces recherches avaient pour but de démontrer la grande importance des paracolibacilles dans nombre de troubles gastro-intestinaux, s'accompagnant de symptômes généraux très fréquents, eux-mêmes indices d'une altération fonctionnelle du foie.

Complétant notre communication préliminaire nous apportons ici quelques données nouvelles en faveur de nos idées sur le mécanisme des infections constatées et sur le rôle des paracolibacilles qu'on rencontre presque toujours dans les fèces et dans le suc duodénal des malades.

Avant d'exposer les résultats de nos travaux, nous voudrions donner quelques indications sur les propriétés morphologiques et biologiques des paracolibacilles. Comme le tableau I nous le montre, les bacilles du groupe paracoli examinés dans nos expériences ne font fermenter le lactose qu'après quatorze jours, la dulcité après sept jours ; ils n'ont aucune influence sur le saccharose, ils font fermenter les autres sucres en dégageant des gaz. Ils décolorent le rouge neutre avec fluorescence. Ils coagulent le lait après dix jours. Ils donnent de l'indol. Envers les sérums agglutinants, ils se comportent comme les autres colibacilles. Les sérums provenant d'animaux préparés avec ces germes n'agglutinent dans la plupart des cas que les souches inoculées, sans exercer d'action appréciable sur les autres colibacilles, même sur les échantillons offrant des propriétés biochimiques semblables. Les sérums agglutinants des germes typhiques, paratyphiques et dysentériques n'ont aucune influence sur eux.

(1) *Paris Médical*, 1932, numéro du 12 novembre 1932.

Nous avons effectué nos expériences sur des cobayes et des lapins auxquels nous avons injecté sous la peau 1 cent. cube et 0 c. c. 50 d'une émulsion d'une culture sur gélose de vingt-quatre heures, de paracolibacilles. Lors de ces injections nous avons pu constater (voir le tableau II) que les animaux ne réagissaient que très faiblement ou pas du tout à cette première inoculation de bacilles. Dans le cas assez rare où une réaction se produit, elle n'apparaît que vingt-quatre ou quarante-huit heures plus tard, et se manifeste, ordinairement, par un faible érythème et un léger œdème. Dans certains cas cette réaction s'accompagne de fièvre de courte durée.

Lorsque nous avons injecté à nouveau ces mêmes animaux après dix, vingt, trente jours, avec la même culture de paracolibacilles, nous avons obtenu des résultats tout à fait différents. La réaction se produisait plus tôt, au cours des premières vingt-quatre heures, et elle se manifestait sous la forme d'un érythème intense et d'un fort œdème, suivi, dans un grand nombre de cas, d'abcès et de nécrose. Nous avons pu isoler de ces abcès des germes semblables à ceux que nous avions injectés. Dans certains cas, surtout chez les cobayes traités auparavant, à plusieurs reprises, la mort, conséquence d'une généralisation bacillaire est survenue au bout de trois à neuf jours.

TABLEAU I.

NUMÉRO du Paracoli	586200
MOBILITÉ	P <u>e</u> u mobile.
LACTOSE	+ après 14 jours.
DEXTROSE	+
MALTOSE	+
SACCHAROSE	—
MANNITE	+
GAZ	+
XYLOSE	+
RAMNOSE	+
ARABINOSE	+
DULCITE	+ après 7 jours
ROUGE NEUTRE	Décoloration. fluorescence.
LAIT	Coagule après 40 jours.
PETIT LAIT tourne-solé	Rougit.
INDOL	Donne de l'indol.
SÉRUM agglutinant Typhique, Para A, Para B	N'agglutine pas.

TABLEAU II. — **Souches 2812, 200, 14.**

NUMÉRO des cobayes normaux	TEMPÉRATURE avant l'injection des bacilles en degrés	DOSE de bacilles et date des injections	INTENSITÉ de la réaction	DOSE de bacilles et date des injections	INTENSITÉ de la réaction	DOSE de bacilles et date des injections	INTENSITÉ de la réaction	OBSERVATIONS
356	38,5	26 mai, n° 2812 1 cent. cube.	—	22 juillet, 0 c. c. 50.	Erythème, œdème.	31 août, 0 c. c. 50.	Abcès.	Le germe spécifique est isolé de l'œdème.
930	38,8	26 mai, n° 2812 1 cent. cube.	40°	22 juillet, 0 c. c. 50.	Erythème, œdème, abcès.	31 août, 0 c. c. 50.	Abcès, 10 septembre, meurt.	Bacilles dans l'abcès, le sang et les organes.
443	39	26 mai, n° 200, 1 cent. cube.	39°5	22 juillet, 0 c. c. 50.	Erythème, œdème.	31 août, 0 c. c. 50.	Abcès.	Bacilles dans l'abcès.
146	39	26 mai, n° 200, 1 cent. cube.	Erythème, œdème très faible.	22 juillet, 0 c. c. 50.	Erythème, œdème.	31 août, 0 c. c. 50.	Erythème, œdème, tuméfaction, sans formation d'abcès.	
944	38,4	26 mai, n° 14, 1 cent. cube.	—	22 juillet, 0 c. c. 50.	Erythème, œdème.			
437	38	26 mai, n° 14, 1 cent. cube.	—	22 juillet, 0 c. c. 50.	Erythème, œdème.	31 août, 0 c. c. 50.	Erythème, œdème, 8 septembre, meurt.	Bacilles dans les organes.

NUMÉRO des cobayes normaux	TRAITEMENT par voie orale	INTENSITÉ de la réaction	TRAITÉS quelques jours après	INTENSITÉ de la réaction	OBSERVATIONS
991	0 c. c. 50. Culture sur gélose de bacilles 200, 1 ^{er} septembre, 6 sep- tembre, 11 septembre.	—	0 c. c. 50 de bacilles vivants par voie sous-cutanée.	Erythème, œdème. abcès.	Paracoli dans l'abcès.
992	0 c. c. 50. Culture sur gélose de bacilles 200, 1 ^{er} septembre, 6 sep- tembre, 11 septembre.	—	0 c. c. 50 de bacilles vivants par voie sous-cutanée.	Erythème, œdème.	
996	0 c. c. 50. Culture sur gélose de bacilles 200, 1 ^{er} septembre, 6 sep- tembre, 11 septembre, n° 14.	—	0 c. c. 50 de bacilles vivants par voie sous-cutanée.	Erythème, œdème, abcès.	Paracoli dans l'abcès.
997	0 c. c. 50. Culture sur gélose de bacilles 200, 1 ^{er} septembre, 6 sep- tembre, 11 septembre, n° 14.	—	0 c. c. 50 de bacilles vivants par voie sous-cutanée.	Erythème, œdème.	
265	0 c. c. 50. Culture sur gélose, n° 586.	—	0 c. c. 50. Culture sur gélose de bacilles, 15 juin.	17 juin, +.	Bacilles dans le sang et organes.
658	0 c. c. 50. Culture sur gélose, n° 6.	—	0 c. c. 50. Culture sur gélose de bacilles, 15 juin.	20 juin, +.	Bacilles dans le sang et organes.
185	0 c. c. 50 de bacilles vi- vants par voie sous- cutanée, 30 septembre.	Erythème, œdème.	0 c. c. 50 de bacilles vivants, 13 septembre.	Abcès.	Bacilles dans l'abcès.
570	0 c. c. 50 de bacilles vi- vants par voie sous- cutanée, 30 septembre.	Erythème, œdème.	0 c. c. 50 de bacilles vivants, 13 septembre	Abcès.	Bacilles dans l'abcès.
964	0 c. c. 50 de bacilles vi- vants par voie sous- cutanée, 30 septembre.	Erythème, tuméfaction.	0 c. c. 50 Culture sur gélose de bacilles, 13 septembre.	28 septembre, +, meurt.	Bacilles dans l'exsudat, les reins et le foie.

TABLEAU IV.

NUMÉRO des cobayes normaux	TRAITEMENT ET DATE	INTENSITÉ de la réaction	TRAITEMENT ET DATE	INTENSITÉ de la réaction	TRAITEMENT ET DATE	INTENSITÉ de la réaction
344	1 cent. cube de bacilles vivants sous la peau, 20 mai.	Erythème.	0 c. c. 50 de bacilles vivants sous la peau, 22 août.	Erythème, œdème.	1 cent. cube de bacilles vivants sous la peau, 4 août.	Erythème.
944	1 cent. cube de bacilles vivants sous la peau, 20 mai.	Erythème.	0 c. c. 50 de bacilles vivants sous la peau, 22 août.	Erythème, œdème.	1 cent. cube de bacilles vivants sous la peau, 4 août.	Erythème.
935	1 cent. cube de bacilles vivants sous la peau, 20 mai.	Erythème.	1 cent. cube de bacilles vivants sous la peau, 18 juin.	Erythème.		
942	1 cent. cube de bacilles vivants sous la peau, 20 mai.	Erythème.	1 cent. cube de bacilles vivants sous la peau, 18 juin.	Erythème.		
832	1 cent. cube de souche de filtrat, 30 juillet.	11 juillet. Erythème, 4 ^{er} août.	0 c. c. 50 de bacilles vivants sous la peau, 5 août.	6 août. Erythème, œdème, 10 août.		
128	1 cent. cube de souche de filtrat, 30 juillet.	Erythème, œdème très faible.	0 c. c. 50 de bacilles vivants sous la peau, 5 août.	Erythème, œdème.		

TABLEAU V.

NUMÉRO des lapins normaux	TRAITEMENT	INTENSITÉ de la réaction	TRAITEMENT	INTENSITÉ de la réaction	TRAITEMENT	INTENSITÉ de la réaction	TRAITEMENT	INTENSITÉ de la réaction	OBSERVATIONS
2	0 c. c. 50 de filtrat injecté par voie sous-cutanée, 10 mars.	—	0 c. c. 50 de filtrat injecté par voie sous-cutanée, 15 mars.	—	0 c. c. 50 de filtrat injecté par voie sous-cutanée, 20 mars.	Erythème, œdème.	0 c. c. 50 de bacilles vivants par voie sous-cutanée, 4 avril.	5 avril. Erythème, œdème, 7 avril, +, meurt.	Bacilles dans le sang et les organes.
192	0 c. c. 50 de filtrat injecté par voie sous-cutanée, 10 mars.	—	0 c. c. 50 de filtrat injecté par voie sous-cutanée, 15 mars.	Erythème, œdème.	0 c. c. 50 de filtrat injecté par voie sous-cutanée, 20 mars.	Erythème, œdème.	0 c. c. 50 de bacilles vivants par voie sous-cutanée, 4 avril.	10 avril, +, meurt.	
4	0 c. c. 50 de ba- cilles vivants, 4 avril.	—							
26	0 c. c. 50 de ba- cilles vivants, 4 avril.	Erythème, œdème.							

Témoins :

A l'autopsie des animaux morts nous avons trouvé de la pleurésie avec exsudats hémorragiques ou fibrino-purulents, de la congestion pulmonaire, de la dégénérescence parenchymateuse et grasseuse du foie et des reins. Dans les exsu-

NUMÉRO des cobayes	PRÉALABLEMENT TRAITÉS PAR VOIE SOUS-CUTANÉE		TRAITEMENT ET DÉSINFECTION 5 septembre	
	Vaccinés par voie sous-cutanée	Vaccinés par voie orale	Par voie sous-cutanée	Par voie orale
553	Préalablement traité, 3 fois; vacciné, 7 fois.		0 c. c. 50 de bacilles vivants.	
842	Préalablement traité, 3 fois; vacciné, 7 fois.			1 culture gélifiée
166	Préalablement traité, 1 fois; vacciné, 7 fois.			
526		Préalablement traité 1 fois; vacciné, 10 fois.	0 c. c. 50 de bacilles vivants.	
171				1 culture gélifiée
386	Préalablement traité, 1 fois.		0 c. c. 50 de bacilles vivants.	
964	Préalablement traité, 1 fois.			1 culture gélifiée
185	Préalablement traité, 1 fois.		0 c. c. 50 de bacilles vivants.	
570	Préalablement traité, 1 fois.			1 culture gélifiée

ats et les poumons nous avons isolé les bacilles inoculés.

De ces résultats nous pouvons conclure que les *cobayes normaux* ne sont pas sensibles ou à peine sensibles à l'introduction de *paracolibacilles vivants*.

A chaque nouvelle injection de ces bacilles la sensibilité des animaux s'accroît de plus en plus, ils se sensibilisent donc.

Déjà dans la note que nous rappelons au début de ce mémoire, nous avons mentionné que les réactions observées traduisent une spécificité de groupe. Nous pouvons compléter cette remarque par les renseignements suivants. Nous avons

INTENSITÉ de la réaction	TRAITEMENT ET DATE 30 septembre		INTENSITÉ de la réaction	OBSERVATIONS
	Par voie sous-cutanée	Par voie orale		
œdème.	0 c.c. 50 de bacilles vivants.		Faible œdème, +, 8 septembre, meurt.	
t 39°4; après 1.	0 c.c. 50 de bacilles vivants.		Erythème, œdème.	
œdème.	0 c.c. 50 de bacilles vivants.		Erythème, œdème.	
t 39°2; après	0 c.c. 50 de bacilles vivants.		Erythème, œdème.	
œdème, œdème, néfaction.				
t 38°8; après 4.		1 culture sur gélose.	+, 9 septembre, meurt.	Bacilles dans les reins et le foie.
s.		1 culture sur gélose.	Avant 38°8; après 40°1.	
t 39°; après	0 c.c. 50 de bacilles vivants.		Abcès.	Bacilles décelés après ponction.

constaté qu'en injectant les différentes souches de paracolibacilles aux animaux sensibilisés, *les manifestations de cette sensibilité* n'étaient pas toujours les mêmes. En examinant les tableaux II et III nous voyons que les injections parentérales des échantillons 200 et 14 n'ont provoqué chez les animaux sensibilisés que la formation d'abcès et de nécroses; de plus, l'intro-

duction par voie orale de ces mêmes bacilles n'a donné lieu à aucun changement particulier en dehors d'une élévation légère de la température. Par contre, l'inoculation par voie sous-cutanée ainsi que par voie orale de l'échantillon 586 a provoqué la mort des animaux sensibilisés. A l'autopsie, nous avons trouvé de la congestion pulmonaire, pleurésie avec exsudats fibrino-purulents, un épanchement péricardique, de la conges-

NUMÉRO des cobayes	PRÉALABLEMENT TRAITÉS PAR VOIE ORALE		TRAITEMENT ET DATE 5 septembre	
	Vaccinés par voie sous-cutanée	Vaccinés par voie orale	Par voie sous-cutanée	Par voie orale
588	Préalablement traité, 2 fois; vacciné, 7 fois.			1 culture gélifiée
876	Préalablement traité, 2 fois, vacciné, 7 fois		0 c. c. 50 de ba- cilles vivants.	
146		Préalablement traité, 2 fois; vacciné, 10 fois.	0 c. c. 50 de ba- cilles vivants.	
261		Préalablement traité, 2 fois; vacciné, 10 fois.		1 culture gélifiée
320	Préalablement traité, 2 fois.			1 culture gélifiée
398	Préalablement traité, 2 fois.		0 c. c. 50 de ba- cilles vivants.	

tion viscérale (foie, rate), des ecchymoses sur la muqueuse intestinale. Dans le sang, les organes et les exsudats, on a trouvé les bacilles du même type que ceux inoculés. Etant donné que toutes ces réactions provoquées dans l'organisme des animaux sensibilisés par cet échantillon, étaient toujours plus fortes que celles provoquées par les autres paracolibacilles employés dans nos expériences, y compris chez les animaux normaux, nous sommes autorisés à dire que dans toutes ces manifestations de la sensibilité des animaux ainsi traités, la virulence des bacilles joue aussi un grand rôle.

Une autre question se pose ici : celle de savoir si cette sensibilité des animaux peut être produite seulement par l'introduction des bacilles vivants ou si on peut la provoquer aussi par l'injection de produits bacillaires. Afin d'avoir des données plus claires sur ce point, nous avons administré sous la peau d'une série de cobayes 1 cent. cube de filtrat d'un bouillon de culture de sept jours de paracolibacilles, puis après un certain

INTENSITÉ de la réaction	TRAITEMENT ET DATE 3) septembre		INTENSITÉ de la réaction	OBSERVATIONS
	Par voie sous-cutanée	Par voie orale		
39°4; après	0 c. c. 50 de bacilles vivants.		Erythème, œdème, +, meurt, 3 octobre.	
hème.	0 c. c. 50 de bacilles vivants.		Erythème, œdème.	
hème, œdème.	0 c. c. 50 de bacilles vivants.		Erythème, œdème.	
39°2; après	0 c. c. 50 de bacilles vivants.		Erythème, tuméfaction.	
39°; après	0 c. c. 50 de bacilles vivants.		Erythème, tuméfaction.	
hème, œdème, tuméfaction.		1 culture sur gélose.	+ , meurt, 3 septembre.	Bacilles dans le sang et les organes.

temps nous avons injecté à ces cobayes 0 c. c. 50 de paracolibacilles vivants par la voie sous-cutanée. A une autre série d'animaux, préalablement traités par les paracolibacilles, nous avons donné, par la voie sous-cutanée, 1 cent. cube de filtrat. On voit d'après le tableau IV que les résultats obtenus ne sont pas assez nets pour pouvoir donner une réponse précise à la question posée plus haut.

A cet égard, les résultats que nous avons pu obtenir chez les lapins sont plus intéressants et plus démonstratifs. La sensibilité des animaux devient d'autant plus forte que les animaux

ont reçu un plus grand nombre d'injections de filtrat. Cette sensibilité s'accroît non seulement vis-à-vis du filtrat injecté, mais aussi vis-à-vis des bacilles eux-mêmes. Suivant le tableau V, 0 c. c. 50 de paracolibacilles vivants administrés par voie sous-cutanée aux animaux préalablement traités avec le filtrat provoque la mort de ces animaux, alors que la même quantité des mêmes bacilles, injectée aux lapins normaux ne

NUMÉRO des cobayes	NORMAUX		TRAITEMENT ET DATE 5 septembre	
	Par voie sous-cutanée	Par voie orale	Par voie sous-cutanée	Par voie orale
957	Vacciné, 7 fois.		0 c. c. 50	
459	Vacciné, 7 fois.			1 culture lose.
326		Vacciné, 10 fois.	0 c. c. 50	
393		Vacciné, 10 fois.		1 culture lose.
317	Normal.			1 culture lose.
328	Normal.		0 c. c. 50	

provoque que la formation d'abcès et un érythème assez marqué.

La mort des animaux relève de l'infection aiguë. Les bacilles ont été trouvés dans les abcès ainsi que dans le sang et les organes.

De ces résultats nous pouvons conclure que les lapins comme les cobayes peuvent se sensibiliser par injection sous-cutanée du filtrat de paracolibacilles.

D'après ce qui précède, il est hors de doute qu'il y aurait intérêt à savoir tout d'abord s'il est possible de désensibiliser

des organismes ainsi sensibilisés, et ensuite, si l'on peut par une vaccination préalable, empêcher la sensibilisation des animaux normaux.

Pour résoudre ce problème nous avons pris deux séries de cobayes, l'une d'animaux normaux, l'autre d'animaux préalablement traités (sensibilisés par voie parentérale ainsi que par voie orale). Nous avons vacciné la moitié de chaque

INTENSITÉ de la réaction	TRAITEMENT ET DATE 30 septembre		INTENSITÉ de la réaction	OBSERVATIONS
	Par voie sous-cutanée	Par voie orale		
Erythème.		1 culture sur gélose.	+, meurt, 4 oc- tobre.	
Ant. 38°5; après 06.	0 c. c. 50 de ba- cilles vivants.		Erythème, tumé- faction.	
Erythème, œdème.		1 culture sur gélose.	+, meurt, 4 oc- tobre.	
Ant. 38°8; après	0 c. c. 50 de ba- cilles vivants.		Erythème, tumé- faction.	
Ant. et après	0 c. c. 50 de ba- cilles vivants.		Erythème, œdème.	
Erythème.		1 culture sur gélose.	Avant 38°9; après 39°5.	

série par voie sous-cutanée, l'autre moitié par voie orale.

Pour la vaccination sous-cutanée, nous avons employé une émulsion dans l'eau physiologique de paracolibacilles tués par la chaleur. Les injections sont effectuées tous les trois à quatre jours à dose toujours plus élevée, en tout sept fois. Après vingt jours de répit nous avons procédé à l'épreuve.

Pour la vaccination par voie buccale, nous avons employé également l'émulsion dans l'eau physiologique de culture sur gélose des bacilles tués par la chaleur (5 milliards dans 1 cent. cube). Le vaccin ainsi que la bile ont été intro-

duits dans l'organisme des animaux au moyen d'une pipette.

Au vingtième jour après la dernière injection, on administre la dose d'épreuve.

Le vaccin était bien supporté par les animaux ; lors de la vaccination nous ne remarquâmes aucune réaction soit locale, soit générale. Deux animaux sont morts dès le commencement de la vaccination (l'un vacciné par voie sous-cutanée, l'autre par voie buccale).

L'analyse du sang avant et après la vaccination a montré : que le taux d'agglutination s'est élevé chez les animaux sensibilisés de $1/50$ - $1/100$ avant, jusqu'à $1/200$ - $1/400$ après la vaccination sous-cutanée, chez les animaux normaux de 0 à $1/200$. Chez les animaux sensibilisés et vaccinés par voie buccale nous n'avons pas pu constater l'apparition d'agglutinines.

Nous avons éprouvé chacune des séries d'animaux vaccinés en leur administrant la dose d'épreuve par voie sous-cutanée ou par voie orale.

Comme dose d'épreuve, par voie sous-cutanée, nous administrons 0 c. c. 50 d'une émulsion des bacilles vivants, qui était deux fois plus forte que celle que nous employons pour la sensibilisation des animaux. Comme dose d'épreuve, par voie buccale, nous choisissons une culture sur gélose de vingt-quatre heures.

Des tableaux VI, VII, VIII, il ressort que la vaccination par voie sous-cutanée ainsi que la vaccination par voie buccale a donné des résultats assez satisfaisants. L'injection sous-cutanée de 0 c. c. 50 de bacilles vivants a provoqué chez les témoins sensibilisés la formation d'abcès et d'œdème. Cependant chez les vaccinés la même dose d'épreuve, appliquée par voie sous-cutanée, n'a produit qu'un peu d'œdème et de l'érythème. Administrée par voie buccale, la dose d'épreuve a provoqué une élévation légère de la température.

La même épreuve effectuée à nouveau un mois après la première a donné les résultats suivants : presque tous les animaux (excepté un) vaccinés par voie sous-cutanée, ont succombé à une infection aiguë ; les animaux vaccinés et éprouvés par voie buccale se sont comportés comme lors de la première épreuve, excepté un animal normal qui a succombé. Il résulte de ces expériences que l'immunité acquise par la vac-

cination sous-cutanée est de courte durée, et que la vaccination préalable par voie sous-cutanée et par voie orale ne peut protéger les animaux contre une sensibilisation ultérieure avec les paracolibacilles vivants.

Nous basant sur l'ensemble de nos expériences, nous pouvons formuler les conclusions suivantes :

1° La sensibilisation de l'organisme à l'égard des paracolibacilles peut être provoquée non seulement par l'administration de bacilles eux-mêmes, mais aussi par celle de leur filtrat. Cette sensibilité accrue se manifeste surtout chez les lapins.

2° Dans toutes les manifestations de sensibilité des animaux préalablement traités, la virulence des bacilles joue aussi un rôle.

3) Les animaux ainsi sensibilisés peuvent être immunisés par voie sous-cutanée ainsi que par voie buccale. L'immunité des animaux sensibilisés acquise par la vaccination sous-cutanée est de courte durée.

SUR UN VIBRION ISOLÉ A DAMAS (SYRIE)
DANS DES CAS DE DIARRHÉE D'ÉTÉ CHEZ L'HOMME
***VIBRIO ENTERITIDIS* (n. sp.),**

par MAURICE HURI.

(*Institut Pasteur.*)

A côté d'un certain nombre de formes de diarrhées d'été des pays chauds, dont on connaît bien aujourd'hui les agents pathogènes, il existe encore de nombreux syndromes intestinaux, fébriles ou non, que les cliniciens dans ces pays désignent sous les noms d'*infection intestinale banale* ou bien d'*infection intestinale chronique*, ou encore d'*auto-intoxication intestinale*, dont on ignore la cause.

Ayant fait systématiquement la culture des selles de malades atteints de ces formes de diarrhée, j'ai pu isoler dans 19 cas, au cours du printemps et au début de l'été 1932, à Damas, un vibron (1) qui se distingue nettement des vibrions déjà décrits, à la fois par quelques-uns de ses caractères cultureux et par ses caractères sérologiques.

Dans une série de cas (série A.), ce vibron a été isolé neuf fois de selles où l'examen direct n'avait pas permis de déceler la présence de protozoaires et de leurs kystes et où les cultures se sont montrées négatives pour toutes bactéries qui auraient pu expliquer la diarrhée.

Dans une deuxième série (série B.), comprenant dix observations, le vibron a été trouvé en même temps que des parasites, vers, protozoaires, ou bactéries pathogènes pour l'homme :

Trois fois avec l'amibe dysentérique (type *Entamæba histolytica*);

Une fois avec l'amibe dysentérique et des œufs de *Trichocéphale*;

Une fois avec l'amibe dysentérique et des œufs d'oxyures;

(1) Voir *C. R. de la Soc. de Biol.*, 111, novembre 1932, p. 678.

Une fois avec l'amibe dysentérique et le *Trichomonas intestinalis* ;

Une fois avec le *Trichomonas intestinalis* ;

Une fois avec le *Tænia* ;

Une fois avec des œufs de Trichocéphale ;

Une fois avec le bacille d'Eberth (convalescent de fièvre typhoïde).

Dans chacun des cas des deux séries, il a été tenu compte des autres variétés de microbes qui ont poussé sur les plaques d'isolement et de la proportion de leurs colonies. Ces résultats sont donnés par le tableau suivant :

VIBRIONS		COLIBACILLES	ENTÉROCOQUES	AUTRES MICROBES
p. 100		p. 100	p. 100	p. 100
Série A.				
A.1	100	0	0	0
A.2	50	45	5	0
A.3	63	35	2	0
A.4	75	20	5	0
A.5	72	18	10	0
A.6	100	0	0	0
A.7	90	10	0	0
A.8	74	24	2	0
A.9	92	8	0	0
Série B.				
B.1	60	40	0	0
B.2	70	15	10	5 (Eberth).
B.3	63	37	0	0
B.4	97	3	0	0
B.5	55	30	15	0
B.6	85	15	0	0
B.7	100	0	0	0
B.8	100	0	0	0
B.9	100	0	0	0
B.10	100	0	0	0

Ni la race, ni le sexe, ni l'âge ne semblent jouer un rôle dans l'atteinte de la maladie. En effet, le vibrion a été isolé huit fois chez des Européens dont 4 hommes et 4 femmes, et onze fois chez des indigènes dont 5 hommes et 6 femmes. L'âge de ces malades était compris entre douze et soixante-treize ans.

EVOLUTION CLINIQUE DE LA MALADIE.

Pour 7 cas, sur les 19 où le vibron a été isolé, les selles m'ont été remises sans aucune indication clinique ; mais il résulte des renseignements relatifs aux 12 autres cas que la maladie débute, d'une façon générale, brusquement par des coliques violentes avec douleurs de tout l'abdomen à la palpation et une diarrhée liquide. Les selles, en moyenne au nombre de 20 par jour, sont abondantes, putrides, de couleur jaune verdâtre. La température oscille généralement entre 37° et 38° pendant les trois ou quatre premiers jours de la maladie et revient ensuite à la normale. Les nausées sont fréquentes, mais les vomissements rares.

Après cette période aiguë, la maladie passe à l'état chronique. La diarrhée s'atténue mais persiste plusieurs semaines. Elle revêt alors une forme intermittente où les crises de débâcle intestinale alternent avec des périodes de constipation. A chaque accès de diarrhée, le vibron peut facilement être mis en évidence par isolement direct sur plaque de gélose, mais pendant les crises de constipation seuls les milieux d'enrichissement, tels que l'eau peptonée, permettent d'isoler ce vibron qui y pousse bien en donnant une amorce de voile entre la septième et la dixième heure.

ASPECT MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE DES SELLES.

Dans les périodes aiguës, les selles sont abondantes, liquides, légèrement glaireuses, l'aspect général rappelant une émulsion gélatineuse peu dense, la couleur variant du jaune verdâtre au vert plus ou moins foncé ; l'odeur est généralement putride et la réaction alcaline. Il n'y a pas trace de sang.

L'examen direct des selles fraîches, diluées en eau physiologique, montre un très grand nombre de bactéries extrêmement mobiles qui traversent rapidement, en zig-zag, le champ microscopique. On trouve un assez grand nombre de cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et une très grande quantité de mucus.

Sur les frotis colorés par les divers procédés en usage, on

retrouve comme éléments cytologiques de nombreuses cellules épithéliales pavimenteuses de l'intestin et de rares polynucléaires, mais jamais d'hématies.

OBSERVATIONS.

Voici, pour illustrer cet exposé, deux observations choisies, l'une dans la série A et l'autre dans la série B.

OBSERVATION A. 4. — G. B..., âgé de trente ans, a été atteint le 15 avril 1932 de diarrhée accompagnée de coliques violentes. Le nombre des selles variait entre 20 à 30 par jour pendant les dix premiers jours. Ces selles ne contenaient pas de sang. La température oscillait entre 37° à 37°5.

A partir du dixième jour, le nombre des selles a diminué progressivement mais se maintient à 2 ou 3 par jour; le malade ressent continuellement des coliques qui l'obligent à faire usage de calmants.

Les selles sont apportées au laboratoire le 15 juin 1933.

1° *Aspect macroscopique* : selles liquides, glaireuses, putrides, couleur verdâtre, réaction alcaline.

2° *Examen microscopique* : pas de protozoaires, pas de kystes, pas d'œufs de vers. Les préparations colorées par le Gram-fuchsine montrent la présence de très nombreux vibrions Gram négatifs qui, sur les préparations fraîches, sont doués d'une grande mobilité;

3° *Cultures* : les isoléments sur plaques donnent les résultats suivants :

Colonies de <i>Vibrio enteritidis</i>	75 p. 100
Colonies de colibacille	20 p. 100
Colonies d'entérocoque	5 p. 100

A partir du 23 juin, le malade est soumis à l'auto-antivirusthérapie locale, 50 cent. cubes *per os* et 100 cent. cubes *per rectum* par jour.

Le 30 juin, la diarrhée ayant disparu, on supprime les instillations rectales et on maintient l'ingestion d'antivirus jusqu'au 7 juillet.

Les selles sontensemencées le 10 juillet; les cultures ne contiennent plus de vibrions.

OBSERVATION B. 1. — M^{me} O..., âgée de quarante-huit ans, présente chaque année au printemps et pendant tout l'été des troubles intestinaux, qu'elle définit mal. Les débuts de l'entérite remontent cette année au 7 avril. Les selles au début, au nombre de 10-12 par jour, étaient peu abondantes, teintées de sang et, au dire de la malade, ressemblaient à des crachats.

Depuis le 20 avril, la malade ressent de fortes coliques, les selles sont devenues très abondantes et liquides. La malade se plaint de refroidissement des extrémités. La température varie entre 37°5 et 38°5.

Le 23 avril, la malade apporte ses selles au laboratoire.

1° *Aspect macroscopique* : selles liquides, glaireuses, de couleur jaune verdâtre, contenant quelques filets de sang;

2° *Examen microscopique* : présence de rares amibes du type *Entamoeba histolytica*. Pas de kystes.

Sur les frottis colorés au Gram-fuchsine, on remarque un feutrage touffu de vibrions ne gardant pas le Gram.

2° *Cultures* : les isolements sur plaques donnent le pourcentage suivant de colonies :

<i>Vibrio enteritidis</i>	60 p. 100
Colibacille	40 p. 100

La malade est perdue de vue.

MORPHOLOGIE ET RÉACTIONS COLORANTES DU VIBRION.

Ce vibron est aussi mobile dans les cultures que dans les selles : il traverse rapidement en zig-zag le champ microscopique où on a peine à le suivre. Il est presque toujours incurvé, en virgule, rarement spirilliforme ou rectiligne. Il se colore faiblement par les couleurs d'aniline, ne prend pas le Gram ; il est à peine teinté en rose pâle par la fuchsine.

Il possède un cil inséré à une extrémité, facilement colorable par les procédés habituels. Dans deux cultures, j'ai pu rencontrer cependant quelques éléments assez rares possédant deux cils insérés chacun à une extrémité.

CARACTÈRES CULTURAUX.

Ce vibron, strictement aérobie, pousse très bien sur tous les milieux ordinaires. Le pH le plus favorable est 8-8,2. La température optima est de 37°.

En eau peptonée, il donne un voile très mince et très fragile que le moindre mouvement désagrège et fait tomber au fond du tube sous forme de poussière fine. Les couches intermédiaires du liquide demeurent limpides. Passées les vingt-quatre premières heures, un petit dépôt pulvérulent se forme ; la couche de liquide intermédiaire entre ce dépôt et le voile qui se reforme pendant six à huit jours reste toujours limpide. La réaction indol-nitreuse, faiblement positive avec certaines souches, peut manquer avec d'autres.

En bouillon ordinaire, dès la cinquième ou sixième heure, on voit apparaître un trouble homogène et un voile extrêmement mince. Vers la dix-huitième heure, ce voile s'épaissit et adhère légèrement à la paroi du tube sur laquelle il dessine une

collerette à peine perceptible; le plus léger tremblement le détache et il tombe lentement: ses bords se replient vers le bas, figurant un parachute. Les jours suivants, le bouillon se trouble davantage et présente des ondes moirées. Vers le huitième jour, le voile tombe en formant un dépôt muqueux qui, par agitation, s'élève en vrille.

Sur gélose ordinaire, au bout de vingt-quatre heures, le diamètre des colonies isolées mesure 0 mm. 5 à 1 mm. 5. Elles sont blanches, lisses et humides; leurs bords sont régulièrement arrondis. Le deuxième jour, elles mesurent 2 millimètres à 2 mm. 5 de diamètre, elles sont légèrement saillantes et jaunâtres au centre, transparentes et plates à la périphérie. Elles se présentent alors sous l'aspect caractéristique de deux disques concentriques superposés, dont l'inférieur déborde le supérieur d'environ $\frac{1}{6}$ du rayon. Les bords des disques sont nettement coupés à angle droit de la vingt-quatrième à la soixante-douzième heure. Les stries sur gélose sont blanches, lisses et humides, à bords réguliers.

Dans le lait, le développement est abondant en vingt-quatre heures, mais il n'y a pas de coagulation.

En lait tournesolé, le développement est abondant sans coagulation ni virage.

En petit-lait tournesolé, le développement est abondant, sans virage; les cultures âgées d'au moins une semaine sont alcalines.

Sur gélatine, on voit apparaître une culture abondante à la surface du milieu dès la vingt-quatrième heure; cette culture s'épaissit dans la suite jusqu'à former, à partir du troisième jour, une couche de 2 millimètres d'épaisseur. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Sur sérum coagulé et ovalbumine coagulée, le vibrion pousse en donnant de toutes petites colonies confluentes le long de la strie, mais la liquéfaction n'a pas lieu.

Milieux sucrés. Le vibrion a été ensemencé sur glycérine, dulcité, mannite, érythrite, arabinose, xylose, glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, lactose, dextrine, inuline, amidon, tant en milieux solides qu'en milieux liquides. Il pousse bien sur tous les milieux sucrés sans exception, mais sans jamais les attaquer.

Ce vibron ne réduit pas le rouge neutre, ne produit pas d'hydrogène sulfuré et ne présente pas de propriétés hémolytiques.

INOCULATIONS AUX ANIMAUX.

Depuis le mois d'octobre 1932, j'ai entrepris des expériences sur les animaux (1) et j'ai poursuivi des recherches sur leurs sérums.

Tous les animaux ne sont pas réceptifs au même degré ni par les mêmes voies d'inoculation. La souris blanche et le *M. cynomolgus* se sont montrés les plus réceptifs. Chez ce dernier animal, on peut reproduire la maladie avec les mêmes symptômes que chez l'homme, soit en inoculant des cultures par voie sous-cutanée ou par voie intrapéritonéale, soit par simple contagion.

La souris blanche, très sensible par voie sous-cutanée et intrapéritonéale, ne réagit pas à l'ingestion. Le rat blanc ne réagit que très faiblement à l'injection intrapéritonéale de fortes doses de cultures jeunes; il est réfractaire aux inoculations sous-cutanées et *per os*. Le cobaye est complètement réfractaire à tous les modes d'inoculation.

Voici les résultats de quelques expériences :

PREMIÈRE EXPÉRIENCE (souche A. 1). — Le 26 octobre 1932, un lot de cinq souris est inoculé avec 0 c. c. 1 d'émulsion d'une anse de culture de vingt-quatre heures dans 10 cent. cubes d'eau physiologique. Le 27 octobre, vingt heures après l'inoculation, un de ces rongeurs est trouvé mort, un est à l'agonie et les trois autres sont très malades. La souris morte présente à l'autopsie un intestin hémorragique rempli d'un liquide jaune et glaireux qui, ensemencé, permet d'isoler les jours suivants 98 p. 100 de colonies de vibrions en tous points identiques à la souche originale. La souris agonisante est sacrifiée et on retrouve chez elle le même aspect de l'intestin. Les cultures du contenu intestinal permettent de retrouver le vibron. Les trois autres souris succombent dans la journée.

Il m'a été impossible, dans toutes ces expériences, de mettre le vibron en évidence dans le sang du cœur de ces rongeurs.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE (souche B. 1). — Le 26 octobre 1932, un lot de cinq souris est inoculé avec les mêmes doses de culture que ci-dessus. Le 27 octobre, deux souris sont trouvées mortes et les trois autres agonisantes.

(1) J'exprime mes vifs remerciements à M. le professeur A. Pettit qui a bien voulu mettre à ma disposition les animaux nécessaires à ces expériences.

Une souris morte et une de celles qui sont à l'agonie sont autopsiées. On retrouve les mêmes lésions que celles décrites dans la première expérience. Les cultures du contenu intestinal permettent, dans chaque cas, d'isoler le vibron. Toutes les autres souris meurent dans la journée.

TROISIÈME EXPÉRIENCE (souche A.5). — Le 5 novembre 1932, un lot de cinq souris est inoculé suivant le même mode. Le 9 novembre, deux sont trouvées mortes le matin et les autres succombent dans la journée. Les autopsies et les cultures donnent des résultats identiques aux précédents.

Tous les essais d'inoculation *per os*, ou par contagion directe chez les souris sont demeurés négatifs.

QUATRIÈME EXPÉRIENCE (souche A.1). — Le *M. cynomolgus* 78 est inoculé par voie intrapéritonéale, le 10 novembre 1932, avec 5 cent. cubes d'émulsion d'une anse de culture de vingt-quatre heures dans 20 cent. cubes d'eau physiologique. Le 11 novembre, l'animal ne manifeste aucun symptôme morbide ; le 12, ses selles commencent à devenir diarrhéiques et, le 13, la diarrhée est intense ; l'animal est trouvé triste dans sa cage. L'hémoculture reste négative. La culture des selles permet d'identifier les jours suivants 99 p. 100 de colonies de vibrions. Le 15, l'animal semble se rétablir, la diarrhée a presque disparu et, jusqu'au 23 novembre, il se maintient en parfaite santé. Le 24, il est de nouveau triste au fond de sa cage et il grimpe difficilement, il a des selles diarrhéiques jaune verdâtres, glaireuses ; la culture de ces selles permet d'identifier 100 p. 100 de colonies de vibrions. L'hémoculture demeure négative. Le 25, l'animal est trouvé mort. A l'autopsie, les poumons, le foie, les reins, l'estomac sont normaux. L'intestin grêle et le gros intestin sont couverts de suffusions sanguines, ils contiennent en très petite quantité un liquide glaireux, jaune verdâtre, d'où les cultures permettent d'isoler des vibrions identiques à la souche originelle.

CINQUIÈME EXPÉRIENCE (souche A.5). — Le 10 novembre 1932, le *M. cynomolgus* 76 est inoculé dans les mêmes conditions que ci-dessus, mais par voie sous-cutanée, avec la souche de vibrions A.5. L'animal, malgré l'apparence d'une bonne santé, a des selles diarrhéiques les 12 et 13 novembre et se rétablit définitivement le 15 novembre. La culture des selles pratiquée le 12 novembre permet d'isoler 62 p. 100 de colonies de vibrions, alors que l'hémoculture est demeurée négative.

Le sérum de cet animal, prélevé huit jours après l'inoculation, a agglutiné sa propre souche à 1 p. 3.000 ; il a également agglutiné plusieurs souches humaines ou provenant de passages sur singes ou souris à des taux variant entre 1 p. 600 et 1 p. 3.000. La réaction de fixation de complément a été également positive. Ces résultats n'ont jamais pu être obtenus avec un sérum anticholérique.

SIXIÈME EXPÉRIENCE. — Le 23 novembre, deux *M. cynomolgus* neufs sont mis dans la même cage que les singes inoculés. Le 1^{er} décembre, l'un des deux animaux contracte, par contagion, de la diarrhée et meurt le 3 décembre. A la nécropsie, on retrouve les mêmes lésions que dans l'expérience n° 4. Les selles ensaumencées pendant la maladie, ainsi que le contenu intestinal prélevé à l'autopsie permettent d'isoler le vibron. Le 29 décembre, le second *M. cynomolgus* présente de la diarrhée et succombe le 30 décembre. Les cul-

tures de selles pendant sa courte maladie, ainsi que les cultures du contenu intestinal prélevé à l'autopsie, ont permis d'isoler un vibrion présentant les mêmes caractères cultureux, biochimiques et sérologiques que les souches originelles.

RÉACTIONS D'IMMUNITÉ.

Les réactions d'agglutination et de fixation de complément essayées avec de nombreux sérums anticholériques d'origines diverses ont toujours été complètement négatives.

Il n'a été possible qu'une seule fois d'obtenir le sérum d'un malade chez qui j'avais isolé le vibrion (souche B. 8). L'auto-agglutination a donné un résultat positif à 1 p. 350; de même, la réaction de fixation de complément a été nettement positive.

Le sérum de ce même malade a également été essayé avec deux autres souches et a donné pour l'agglutination les résultats suivants :

Souche A. 4 : agglutination positive à 1 p. 100.

Souche B. 9 : agglutination positive à 1 p. 150.

De même, la réaction de fixation de complément s'est montrée positive pour ces deux souches.

Etant donnée la rapidité avec laquelle les souris sont tuées, il a été impossible d'employer le sérum de ces animaux pour les recherches. Quant aux cobayes, animaux absolument réfractaires au vibrion en cause, il a été impossible de déceler dans leur sérum la moindre trace d'anticorps, malgré l'inoculation souvent répétée de fortes doses de vibrions.

Le *M. cynomolgus*, qui fait une atteinte semblable à la maladie humaine, fournit entre le huitième et le douzième jour un sérum riche en anticorps. En effet, les sérums des *M. cynomolgus* 76 et 78 ont agglutiné toutes les souches d'origine humaine ainsi que celle provenant de divers passages sur singes et sur souris.

Les singes vaccinés résistent à l'inoculation de fortes doses de cultures.

TRAITEMENT.

Les traitements habituels chez l'homme se montrent généralement inefficaces. Les auto-vaccins par voie sous-cutanée ne donnent guère de meilleurs résultats. Par contre, la vaccination

locale, suivant la méthode de Besredka, soit avec une émulsion microbienne, soit avec l'antivirus, s'est montrée active dans les 11 cas traités.

J'ai employé l'antivirusthérapie buccale et les instillations en goutte à goutte rectales.

En résumé, le vibron étudié par nous, qui est peut-être la cause d'un certain nombre de diarrhées d'été, diffère de tous les vibrions connus jusqu'à présent, par l'absence complète de propriétés protéolytiques, ainsi que par ses caractères biochimiques et sérologiques. Il n'est pas agglutiné par le sérum anticholérique.

Il est pathogène pour la souris et le *M. cynomolgus* et détermine chez ce dernier animal une maladie semblable à la maladie humaine.

SUR L'ACTION FAVORISANTE DU PLOMB DANS LES HYDROGÉNATIONS PAR L'AMALGAME DE SODIUM

par M. GABRIEL BERTRAND et M^{me} S. DELAUNEY-AUVRAY.

Depuis que Kékulé a réussi à transformer les acides fumarique et maléique en acide succinique par l'action de l'amalgame de sodium en présence de l'eau [1], cet amalgame est devenu, comme réactif d'hydrogénation, d'un usage courant dans les laboratoires de chimie. Le mercure ne paraît intervenir que pour modérer la réaction de l'eau sur le métal alcalin et tout se passe comme si chaque atome de sodium [2] réagissant sur une molécule d'eau :



libérât de l'hydrogène atomique, plus apte à entrer en combinaison que l'hydrogène moléculaire.

En pratique, il n'en est pas entièrement ainsi ; une fraction plus ou moins grande de l'hydrogène se dégage à l'état gazeux et l'on doit employer un excès de réactif. Il arrive même, parfois, que l'hydrogénation par l'amalgame de sodium donne lieu à des échecs complets. C'est ainsi que O. Aschan, répétant une expérience de Herrmann sur la réduction de l'acide benzoïque [3], a d'abord dépensé plusieurs kilogrammes d'amalgame alcalin sans résultat parce qu'il avait préparé son réactif dans une marmite émaillée et qu'une certaine proportion d'étain était passée en dissolution dans l'amalgame. Aschan a recommandé, à la suite de ses expériences, de n'employer que du mercure soigneusement purifié et d'éviter, pour la préparation, de se servir de récipients susceptibles d'introduire des métaux étrangers [4]. La même année, Ad. von Baeyer dans ses recherches sur la constitution du benzène [5], plus tard, E. Fischer au cours de ses travaux sur les synthèses dans la série des sucres, ont éprouvé des échecs analogues ; ils ont émis la supposition

que des traces de fer pouvaient entraver l'action hydrogénante de l'amalgame de sodium et ils ont proposé de préparer celui-ci dans un creuset de terre ou dans un mortier de porcelaine à partir de mercure aussi pur que possible [6].

Ces précautions sont devenues classiques, sans que l'on soit parvenu à expliquer le mécanisme de l'action inhibitrice des métaux étrangers au mercure et au sodium. Aussi les résultats que nous avons obtenus en ajoutant de petites quantités de plomb à l'amalgame alcalin présentent-ils à la fois un intérêt pratique et un intérêt théorique [7].

Nos expériences ont été effectuées en faisant agir comparativement l'amalgame de sodium pur et le même amalgame additionné de doses croissantes de plomb sur le galactose. Dans cette action, l'hydrogène libéré se fixe sur la fonction aldéhydique du galactose et celui-ci est transformé en dulcité [8]. On peut suivre la marche de la transformation, d'une part, en dosant le galactose restant par son pouvoir réducteur ou son pouvoir rotatoire, d'autre part, en séparant la dulcité. Nous avons employé à la fois ces divers moyens de contrôle.

Le galactose a été préparé par hydrolyse du sucre de lait et purifié par des cristallisations dans l'alcool jusqu'à pouvoir rotatoire constant. Trouvé :

$$\alpha_D = \frac{16.0 \times 25 \text{ cent. cubes}}{2 \text{ gr. } 48 \times 2d} = + 80.6 \text{ à la température de } + 19^\circ.$$

Pour les amalgames, on a pris du mercure distillé dans le vide, du sodium séparé au moment du besoin, en morceaux à surface brillante, de gros lingots de sodium commercial, enfin de la limaille de plomb obtenue avec une râpe fine à partir de cylindres de métal pur du commerce. La proportion de sodium a été de 2,5 p. 100 dans tous les amalgames. Celle du plomb a varié suivant les expériences.

L'amalgame de sodium a été préparé dans un creuset en terre réfractaire, en prenant les précautions connues aujourd'hui dans tous les laboratoires. Pour obtenir l'amalgame au plomb, on mettait la limaille dans une capsule de porcelaine et l'on versait dessus une petite quantité de mercure. Par un léger chauffage et en remuant avec une baguette de verre, l'amalgamation se faisait très facilement. Quand elle était com-

plète, on versait le produit dans le creuset contenant le reste du mercure nécessaire à l'opération. On chauffait et ajoutait le sodium à raison de 25 grammes par kilogramme.

Dès qu'ils étaient formés, les amalgames étaient coulés dans des cuvettes en porcelaine à photographie, où ils cristallisaient par refroidissement. On les enfermaient aussitôt après dans des flacons bouchés à l'émeri.

L'amalgame de sodium à 2,5 p. 100 est facile à réduire en poudre grossière, très commode pour l'emploi. Il en est de même de ceux qui contiennent en outre 1 ou 2 millièmes de plomb. Mais l'amalgame de sodium à 5 millièmes de plomb est déjà très dur, difficile à pulvériser, de décomposition lente par la solution à hydrogène; tout en donnant à peu près les mêmes rendements que les amalgames moins riches, il ne se prête donc pas aussi bien aux expériences d'hydrogénation.

Chaque expérience a porté sur 10 grammes de galactose, dissous au bain-marie dans 50 cent. cubes d'eau. La solution était faite dans un flacon à large goulot d'une contenance de 1.500 cent. cubes. Après refroidissement, on ajoutait une portion d'amalgame pulvérisé de 50 grammes et, en même temps, un volume d'acide sulfurique au $\frac{1}{5}$, juste suffisant pour saturer la soude qui allait se former. On agitait très vivement. Lorsque la réaction, accompagnée d'un certain dégagement d'hydrogène, était terminée, on refroidissait un peu dans la glace, on ajoutait une nouvelle portion de 50 grammes d'amalgame, de l'acide sulfurique, et ainsi de suite, jusqu'à ce que l'on ait employé 1 kilogramme d'amalgame. La transformation du galactose en dulcité, assez rapide au commencement de l'opération, se ralentit au fur et à mesure et, vers la fin, ne progresse pratiquement plus.

On ajoute assez d'eau pour dissoudre le sulfate de sodium et séparer le mercure par décantation. On lave un peu. On sature presque exactement la solution acide, au papier de tournesol, et l'on y ajoute deux volumes d'alcool à 90°; après une demi-heure à une heure de repos, on sépare le sulfate de sodium précipité qu'on lave avec de l'alcool à 60° et l'on amène, après concentration dans le vide, par distillation au bain-marie, le liquide sucré au volume exact de 200 cent. cubes. Sur 1 ou sur 2 cent. cubes, on procède au dosage du galactose restant d'après

le pouvoir réducteur (méthode G. Bertrand). Dans une des expériences rapportées plus loin, nous avons aussi déterminé le galactose par le polarimètre. Il est alors facile de calculer la quantité de dulcité qui a pu prendre naissance.

Le reste de la solution (198 ou 199 cent. cubes) est additionné de 400 cent. cubes d'alcool à 90° bouillant, ce qui permet de séparer, après refroidissement, une nouvelle quantité de sulfate de sodium. Le liquide est concentré dans le vide, d'abord au bain-marie par distillation dans un ballon, jusqu'à sirop clair (50 cent. cubes environ), puis à froid dans une capsule. On obtient, en quelques jours, une pâte cristalline que l'on essore à la trompe sur un petit entonnoir. La masse cristalline est broyée dans un mortier avec quelques centimètres cubes d'alcool à 50 p. 100, on essore à nouveau, on recommence deux fois ce lavage et on termine en se servant de quelques centimètres cubes de solution aqueuse saturée de dulcité. Finalement, on sèche et on pèse les cristaux. On a directement de cette manière le rendement en dulcité, mais à cause de la solubilité de cette substance dans l'eau-mère (environ 3 parties 1/2 dans 100 d'eau à + 20°), ce rendement est au-dessous de celui qui est calculé d'après la diminution du pouvoir réducteur. Dans nos expériences, nous avons opéré aussi comparativement que possible en amenant les concentrations au même degré et en lavant avec les mêmes volumes de liquide.

Voici, en négligeant les essais préliminaires, ce que nous avons obtenu :

A. — Avec l'amalgame de sodium à 2,5 p. 100.

	EXP. I	EXP. II	EXP. III
Durée de l'opération, en heures.	5	5,40	5,15

Dosage volumétrique :

Galactose restant, en grammes	3,05	2,37	3,22
Galactose transformé p. 100.	69,5	70,8	67,8

Dosage polarimétrique :

Galactose restant, en grammes	»	3,08	»
Galactose transformé p. 100.	»	68,4	»

Dosage pondéral :

Dulcité pesée p. 100.	64,2	64,6	62,1
-------------------------------	------	------	------

B. — Avec l'amalgame de sodium à 2,5 p. 100 additionné de :

	1 p. 1.000 DE Pb		2 p. 1 000 DE Pb	
	EXP. IV	EXP. V	EXP. VI	EXP. VII
Durée de l'opération, en heures.	3	3,30	4,30	4,30

Dosage volumétrique :

Galactose restant, en grammes. .	Presq. indos.	1,09	Presq. indos.	Presq. indos.
Galactose transformé, p. 100 .	> 90	89,4	> 90	> 90

Dosage pondéral :

Dulcite pesée p. 100	77,3	75,8	89,9	90,9
--------------------------------	------	------	------	------

Malgré la multiplicité des opérations, l'entraînement de petites quantités de galactose et de dulcite par le sulfate de sodium, la limite de précision des dosages, on voit qu'il y a une différence importante entre l'action de l'amalgame de sodium pur et celle du même amalgame additionné de plomb. La différence apparaît encore plus grande si l'on observe que la dulcite recueillie et pesée est beaucoup plus pure quand elle est produite avec le second amalgame qu'avec le premier : elle possède presque d'emblée le point de fusion maximum, tandis que l'autre doit être recristallisée une ou deux fois pour arriver au même point.

Ainsi, contrairement à l'opinion classique, l'addition d'un métal étranger à l'amalgame de sodium ne nuit pas forcément à l'action hydrogénante de celui-ci ; il peut même la catalyser positivement, la rendre à la fois plus rapide et plus complète, ce qui présente un grand intérêt au point de vue de la pratique du laboratoire. E. Fischer, en traitant le galactose par l'amalgame de sodium, a obtenu un rendement de 50 p. 100 en dulcite [9]. Nous sommes parvenus, comme on le voit plus haut, à porter ce rendement à 70 p. 100 environ avec le même amalgame et à plus de 90 p. 100 en nous servant d'amalgame additionné de plomb.

Il est encore difficile de donner une théorie convenable des résultats que nous venons de rapporter. Celle qui se présente tout d'abord à l'esprit est la production temporaire d'un hydrure de plomb, mais sans doute est-il préférable, avant d'en faire état, d'attendre de nouvelles expériences.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 1861, 1^{er} supplément, p. 129.
- [2] Probablement après son union avec le groupement chimique intéressé.
- [3] *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 132, 1864, p. 75.
- [4] *Ber. d. deut. chem. Ges.*, 24, 1891, p. 1864.
- [5] *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 265, 1891, p. 169.
- [6] *Ber. d. deut. chem. Ges.*, 25, 1892, en note p. 1253.
- [7] R. WILLSTAETTER, F. SEITZ et E. BUMM ont cherché les effets produits par divers métaux, à la concentration d'un millième, sur la décomposition de l'eau par l'amalgame de sodium; ils ont trouvé que la vitesse de cette décomposition était généralement augmentée, mais dans une proportion très variable, suivant les métaux : le cuivre et l'argent agissaient faiblement, le plomb et l'étain étaient plus actifs (*Ber. d. deut. chem. Ges.*, 61, 1928, p. 871).
- [8] Cette transformation a été réalisée la première fois par G. Bouchardat (*Ann. Chim. Phys.*, 4^e série, 27, 1872, p. 69).
- [9] *Ber. d. deut. chem. Ges.*, 25, 1892, p. 1247.

RECHERCHES
SUR QUELQUES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES
DE L'ŒCOLOGIE DES LARVES D'ANOPHÈLES AU TONKIN.

par HENRY G. S. MORIN et H. BADER.

(*Institut Pasteur de Hanoï*).

I. INDICE CARBONIQUE DES EAUX COURANTES DU TONKIN
EN SAISON FROIDE (MOUSSON DE NORD-EST).

Suivant un vieux dicton annamite : « L'eau du Fleuve-Rouge est boueuse mais saine, tandis que celle de la Rivière Noire, très limpide, donne la fièvre ». Cette opposition très nette en saison fraîche surtout (novembre-avril) entre les eaux des cours d'eau de la Haute-Région et ceux des zones basses est un caractère général dans toute l'Indochine. Elle constitue la base de la ferme croyance locale en l'origine hydrique de la malaria.

Les premières recherches entomologiques faites en Indochine ont, dans les grandes lignes, confirmé la constatation populaire en montrant la différence des faunes anophéliennes que l'on observe dans la région palustre et dans la zone saine.

Ultérieurement, il a pu être établi que les vecteurs principaux de l'endémie palustre en Indochine, *A. minimus*, *A. maculatus* et *A. jeyporiensis* ne déposaient pratiquement leurs œufs que sur des eaux vives, très propres, fréquemment renouvelées, ce qui permet de comprendre la localisation, paradoxale à première vue, de l'endémie aux zones accidentées et largement irriguées par des eaux très activement courantes.

Il semble donc bien acquis que, dans ce pays et tout au moins en ce qui concerne le bassin hydrographique du Fleuve-Rouge, qui a été particulièrement étudié à cet égard, la fréquence de certaines espèces pathogènes soit en rapport direct avec la nature de l'eau.

Les premières constatations faites par l'un de nous en colla-

boration avec Farinaud et Toumanoff ont été amplement confirmées par des observations ultérieures poursuivies pendant plus de deux ans et étendues à toutes les provinces de la haute région du Tonkin.

On pouvait donc se demander s'il n'existait pas entre la composition chimique des eaux de la région insalubre quelque trait commun la différenciant de celle de la zone saine.

Les différences de climat, en effet, ne semblent pas, dans beaucoup de cas, assez marquées entre tel point salubre et tel autre malsain pour justifier une pullulation larvaire aussi différente qualitativement et quantitativement.

Il a donc été décidé d'entreprendre une enquête systématique sur la composition chimique de l'eau des gîtes larvaires, mais il est rapidement apparu que les données recueillies étaient fortement influencées par les saisons. Les résultats de ces investigations ne pourront être entièrement interprétés qu'après des recherches plus prolongées.

En comparant cependant de façon systématique les résultats de l'analyse des points d'eau contenant des larves d'anophèles avec la composition de certaines collections qui en sont paradoxalement dépourvues, à toute proximité de gîtes très favorables, diverses constatations ont pu être faites. Les premières ne sont que la confirmation des recherches poursuivies dans le même sens par Mac Gregor, senior White et Williamson, Sebenmezov, Smorodinev, Adowa, Badenoch, etc., la plupart des espèces anophéliennes sont relativement tolérantes à des écarts de pH assez considérables. Il est exceptionnel, par contre, de trouver des *A. minimus* et *A. aconitus* ou *jeyporiensis* dans des eaux contenant de l'ammoniaque bien que le taux de 1/1.000.000 admis par senior White ne soit pas, au Tonkin, une limite toujours aussi stricte. Ici, non seulement les insectes du groupe *vagus* mais *sinensis* lui-même admettent parfois des taux nettement plus élevés : 3 p. 1.000.000. Dans certains cas, la richesse marquée en manganèse de l'eau (de l'ordre du 1/1.000.000) a coïncidé avec l'absence totale de larves. Par contre, ainsi que Williamson l'a observé, ni le fer, ni la magnésie ne semblent s'opposer de façon absolue au développement des larves d'anophèles. Une forte minéralisation ne semble pas être un obstacle par elle-même, isolément, à cette pullulation.

Dans certains cas de ruisseaux dont les berges étaient faites d'amas de « stériles » provenant du lavage de minerais d'étain et de zinc il a été impossible de trouver des larves alors que celles-ci abondaient dans les collections d'eaux voisines. De même, certaines collections d'eau ou certains ruisseaux encadrés de déchets de charbon « décharges » provenant de galeries ou de découverts voisins se sont montrés paradoxalement dépourvus de larves d'anophèles. C'est peut-être là, soit dit en passant, la cause de l'assainissement spontané observé dans certaines exploitations minières très insalubres au début et qui, au bout de quelques années, au contraire, ne semblent plus constituer que des foyers palustres d'activité très modérée, malgré un renouvellement fréquent de main-d'œuvre très réceptive. Ces diverses constatations, tout en confirmant l'importance de la composition chimique de l'eau ne permettaient cependant de déceler aucun élément commun autorisant à une conclusion d'ensemble.

Il apparut donc rapidement que seule une comparaison systématique du détail des résultats d'analyses effectuées toujours de la même façon pourrait fournir éventuellement le renseignement cherché. Le protocole d'analyse type du service de Surveillance des Eaux a été établi par Guillemin sur la base de l'expérience prolongée de l'hydrologie locale acquise par les travailleurs de l'Institut Pasteur de Saïgon : Calmette, Simond, Metin, Breaudat, Noc, Broquet, Denier, Huët, Noël Bernard, Bablet, Rosé.

Importé à Hanoï dès la création du laboratoire de chimie par l'un de nous, ce même protocole allait permettre les plus exacts parallèles.

D'assez larges variations portant sur les divers éléments constituants ne semblaient pas correspondre à des modifications constantes du peuplement larvaire anophélien des collections d'eau correspondantes. En particulier les carbonates, suivant l'expression humoristique de senior White, sont à cet égard le désespoir régulier du chercheur. Cependant, un certain parallélisme s'observait entre la minéralisation et la teneur en acide carbonique, en particulier dans les collections d'eau riches en larves. Les eaux très minéralisées attiraient d'autant plus l'attention que ce type d'eau est assez caractéristique des eaux

de la nappe profonde du delta tonkinois qui alimente l'adduction d'eau de la ville de Hanoï. Or les élevages de larves au laboratoire, faciles à Saïgon avec l'eau de la ville d'origine relativement superficielle, pauvre en sels, donnaient des mécomptes avec l'eau de robinet de Hanoï. On pouvait donc se demander si un excès de composés minéraux n'était pas défavorable aux larves d'anophèles. Des observations courantes montrèrent bientôt que cela ne constituait pas une règle générale. Par contre, en vérifiant le rapport des éléments entre eux, l'un de nous s'aperçut que, de façon très générale, le rapport

$$\frac{\text{gaz CO}^2}{\text{alcalinité totale}}$$

était supérieur à l'unité dans l'eau des gîtes larvaires à anophèles et que, par conséquent, il devait exister constamment dans ces eaux une certaine quantité de gaz carbonique à l'état libre dissous.

En effet, dans la pratique hydrologique, on dose, d'une part, « l'acide carbonique libre et demi-combiné » et, de l'autre, ce que l'on est convenu d'appeler « l'alcalinité totale ».

Pour effectuer la première de ces deux opérations, on commence par saturer un volume donné de l'eau étudiée par un volume connu d'eau de chaux titrée. On fait alors un dosage alcalimétrique du mélange à l'aide d'acide oxalique N/10 en présence de phénolphthaléine. Par différence, on établit la quantité de CO² libre et demi-combiné en milligrammes par litre.

Pour doser « l'alcalinité totale », on détermine la quantité d'acide sulfurique N/10 nécessaire pour amener le virage de l'hélianthine dans un volume donné de l'eau à étudier. Un volume égal d'eau distillée traité de la même façon permet d'apporter au résultat brut la correction nécessitée par l'emploi de cet indicateur spécial.

En sorte qu'en définitive, et bien que l'on ait l'habitude d'exprimer l'alcalinité totale en CaO, il est aussi logique de l'exprimer en CO² correspondant à l'acide sulfurique employé et de la considérer comme la réceptivité potentielle, la capacité d'absorption maxima actuelle de l'eau considérée pour le CO².

Si le chiffre obtenu est plus élevé que celui trouvé pour le taux d'acide carbonique libre, et demi-combiné, on ne peut rien en conclure.

Mais si, au contraire, le taux du CO² libre et demi-combiné

au total est supérieur au taux de réceptivité en CO^2 de l'eau examinée, on est en droit de considérer que tout se passe comme si la différence entre les deux nombres représentait de l'acide carbonique libre.

Pour la commodité du langage, nous désignerons sous le nom d'indice carbonique le nombre qui exprime la masse en milligramme-litre de CO^2 , excédant la masse de CO^2 prévisible par le dosage à l'hélianthine. L'indice carbonique représenterait donc l'excès du gaz carbonique, libre et demi-combiné actuel, sur le gaz carbonique potentiel. Il est d'ailleurs satisfaisant pour l'esprit de considérer que l'eau examinée contient alors du CO dissous à l'état libre.

En effet, de nombreux travaux ont récemment attiré l'attention sur les propriétés stimulantes de ce corps au point de vue biologique et Portier le considère comme « l'excitant vital » par excellence. Il ne paraît donc pas sans intérêt de caractériser les eaux « vives » par le fait qu'elles contiennent une proportion assez considérable de ce gaz à l'état libre, peut-être naissant.

L'observation montre, en effet, que les eaux les plus pures, en particulier celles des sources de haute région, présentent les indices les plus élevés. Au contraire, les eaux stagnantes des mares, par exemple, et même les eaux de certains arroyos boueux du delta ou de la basse région s'en montrèrent immédiatement dépourvus en saison dite « sèche » (mousson Nord-Est).

Nous avons pu recueillir, de mars 1931 à mars 1933, et comparer, plus de quatre cents échantillons d'eaux différents. Mais les variations saisonnières considérables que nous avons observées nous ont empêché de pouvoir tirer de nos recherches des conclusions avant ces délais relativement étendus. Nous n'examinerons tout d'abord que les documents qui se rapportent à la saison fraîche (mousson Nord-Est). Nous les avons groupés sous trois titres principaux : 1° sources, émergences et ruisseaux rapides ; 2° cours d'eaux secondaires ; 3° fleuve et arroyos du delta.

Le premier seul de ces trois groupes concerne, en général, des gîtes larvaires ; cependant, sur les bords de la plupart des cours d'eau secondaires de la moyenne région, en mousson de

Nord-Est, on peut, à certains moments, trouver des larves de *minimus*. Dans la troisième catégorie, au contraire, il est tout à fait exceptionnel de découvrir des larves d'anophèles. Bien plus, dans les collections d'eau de la basse région en général, on ne découvre pratiquement jamais de larves de *minimus* ainsi que l'ont établi les recherches du Service antipaludique au Tonkin auxquelles les publications récentes de Toumanoff fournissent des bases numériques importantes.

Or, les deux premiers seuls de ces trois groupes présentent un indice carbonique élevé. Alors que les indices de 80 à 50 sont courants dans les sources, ceux de 15 à 30 dans les ruisseaux et rivières, durant toute la saison froide, dans les lents arroyos du delta le taux des indices observés est très bas, ordinairement nul.

Il existe donc un parallélisme curieux entre le peuplement anophélien des divers tronçons de l'arbre hydrographique du Tonkin et l'indice carbonique des eaux. Ce fait nous a paru intéressant à signaler, car non seulement la distribution d'ensemble des taux élevés répond à la répartition des sites décrits par l'un de nous avec M. Toumanoff, mais encore dans la grande majorité des cas, on observe pour un même cours d'eau et ses affluents, une chute régulière de l'indice carbonique d'amont en aval ainsi que le montre le tableau ci-joint.

Dans un travail ultérieur, nous étudierons les variations du phénomène pendant la mousson d'été. Disons simplement ici qu'il y a une inversion saisonnière remarquable de la distribution des indices dans certaines zones.

L'application de ces données à l'examen des eaux dites stagnantes permettra sans doute des distinctions parmi des collections d'eau d'apparence extérieure identique, mais d'importance entomologique, épidémiologique et probablement prophylactique tout à fait différentes. Il serait intéressant dans la pratique d'arriver à établir, lorsque toutes les collections d'eau en apparence semblables ne sont pas peuplées d'anophèles vecteurs, lesquelles le sont effectivement, ou en puissance et pour quelles raisons au moins générales et approchées.

Enfin, on pourrait peut-être considérer d'ensemble un certain nombre de problèmes épidémiologiques sous cet aspect commun, en particulier celui des épidémies brutales et éphé-

mères de paludisme observées dans certains bas pays d'Extrême-Orient : Indes Anglaises (Covell), Java (Brug et Walch), Sumatra (Walch), Annam (Simon, Grall, Gaide, Normet, Biaille de Langibaudière). Le problème des épidémies consécutives aux inondations, qui est commun à tant de pays et enfin la question, souvent si délicate, des irrigations et de la malaria, déjà étudiée en Italie, au Portugal par de nombreux auteurs, plus près de l'Indochine, au Bengale, par Bentley y trouveraient peut-être aussi des éclaircissements intéressants.

S'il se confirmait, comme les recherches en cours semblent l'indiquer, que les variations de l'indice carbonique affectent avec la prédominance saisonnière ou épisodique d'une espèce vectrice déterminée des rapports relativement stricts et constants, un facteur probablement important dans l'éclosion souvent mystérieuse de certaines épidémies palustres y pourrait être reconnu et peut-être modifié dans certaines conditions.

**Indice carbonique relevé dans divers cours d'eau
au Tonkin en Mousson nord-est 1931-1933.**

Bassin de la Rivière-Noire :

Ruisseau affluent à Hoà-Binh	73,48
Rivière-Noire bac Hoà-Binh	22,88
Rivière-Noire aval Phuong-Lam	12,54

Bassin du Fleuve-Rouge :

Sources, émergences environs de Lao-Kay	43-61-30
Nam-Thi amont de Lao-Kay	12,44
A Viétri	0
A Hanoï	0

Bassin de la Rivière Claire :

Sources environs Hagiang	84,4-29,7
Ruisseaux affluents à Phu-Hô	24,2-28,38-38,20-37,48
Rivière Claire en amont du confluent du Sông-Mièn	45
En aval	36,2
A Vinh-Tuy	20,68
Amont Viétri	0

Bassin du Day :

Ruisseaux de la région de Luong-Son	12.24-13,74-16,64
Le Day à Phu-Ly	0

Bassin du Sông Cầu :

Ruisseau à Cho-Chu.	24,2
Ruisseau à Tri-Cu.	23,1
Émergences environs Tri-Cu	60-84,7
Sông-Cầu à Thai-Nguyên.	18,6
Sông-Cầu à Dap Cầu.	11,22
Petit arroyo Bac-Giang.	0,88
Canal des rapides route de Haïphong	0
Canal des Bambous (deux prélèvements).	0,0
Sông Lai-Vu route de Haïphong	0

II. — VARIATIONS SAISONNIÈRES DE L'INDICE CARBONIQUE DES EAUX COURANTES DE SURFACE.

Dans le précédent chapitre, on a défini l'« indice carbonique » des eaux et montré que la valeur de cet indice décroît dans les rivières du Tonkin en descendant leur cours. Très élevé dans les sources et dans les ruisseaux, cet indice est en hiver très bas dans la région deltaïque. Dans le premier chapitre, comme dans celui-ci, on a volontairement borné les conclusions à la zone d'eau douce du Delta. En bordure de la mer existe, en effet, plus étendue dans le nord que dans le sud, une zone d'eaux plus ou moins mélangées d'eau de mer, suivant les saisons, et qui semble mériter une étude à part. Au reste, les limites admises de cette zone, quoique mal fixées encore, concordent assez bien, en ce qui concerne au moins le delta sud, avec les frontières d'une région dans laquelle le paludisme, pratiquement absent dans le delta, reparait sous une forme souvent atténuée ou épisodique, mais enfin se manifeste comme une endémie incontestable.

Les documents recueillis sur cette zone maritime basse sont actuellement trop peu nombreux pour permettre aucune conclusion, mais il apparaît déjà comme vraisemblable qu'ils doivent être classés à part.

Nous examinerons donc ici uniquement les résultats des analyses d'eau effectuées dans les eaux courantes à l'exclusion de la zone de remontée des eaux saumâtres, pendant la mousson d'été. Les observations ont porté sur deux années ayant été poursuivies de mars 1931 à mars 1933.

En ce qui concerne les sources, émergences et ruisseaux nous

avons peu de renseignements en raison même de l'origine de l'enquête. Beaucoup de ruisseaux de saison sèche se sont transformés en juillet-août en petites rivières. Les ruisseaux actuels ne sont bien souvent que des ruissellements accidentels ou éphémères. Comme dans l'ensemble ces gîtes ne présentent plus à cette époque que peu d'intérêt au point de vue entomologique, les larves de *A. minimus* ayant en bien des points pratiquement disparu de leur cours, on s'explique pourquoi les prélèvements y ont été aussi peu nombreux.

Cependant, deux points d'altitude, le Tam-Dao et Chapa, et

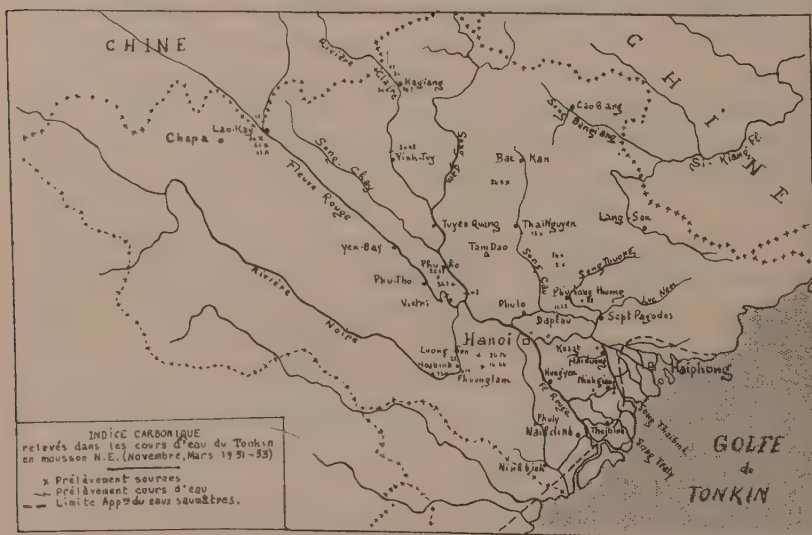


FIG. 1.

un point situé à la limite du Delta, mais au pied des premiers mamelons, le camp d'aviation de Tong, ont été examinés à cet égard.

Au Tam-Dao (800 mètres), deux points d'eau courante ont présenté respectivement des index de 40,62 et 55.

A Chapa (1.500 mètres), deux sources captées pour les besoins de l'alimentation des estivants fournissent des indices élevés : 110 et 103.

Au voisinage immédiat du camp de Tong, un ruisseau et une source atteignent respectivement les taux de 77 et de 110.

L'altitude n'a donc pas un rôle bien apparent. Un caractère commun à ces six points ne peut être trouvé que dans l'aspect limpide de l'eau des prélèvements et dans une fixité assez accusée de sa composition minérale. L'indice carbonique semble donc rester élevé en toutes saisons dans les eaux de source authentiques, et les ruisseaux très près de leur lieu d'origine. En aval, il apparaît immédiatement que le taux de l'indice varie mais de façon si peu régulière en apparence qu'il faut arriver au Delta pour parvenir à saisir l'ensemble du phénomène.

Dans le Delta, en juillet, août, tous les indices sont à leur acmé, surtout dans la partie la plus éloignée de la mer. A Hanoi, le Fleuve Rouge donne 101,84, à Hung-Yên (voir carte), 51,42. Le Day varie de 23,54 à Phu-Ly à 46,64 à Ninh-Binh. Le canal des bambous 53,02 à Ninh-Ciang, le Sông Tra-Ly à Thai Binh 44. Le point d'indice le plus élevé est avec Hanoi, Kêsat (Sông Ke-Sat) 91,52. Le même cours d'eau donne encore 62,48 à Haiduong. Le Sông Thuong à Phu-Lang-Thuong 69,7 — à Dap-Câu, en août, le Sông Câu atteint 62,7.

Il y a pour la région deltaïque dans l'ensemble une élévation estivale de l'indice carbonique très nette et qui contraste absolument avec l'abaissement général observé en hiver.

Il se produit en un mot pour le Delta une inversion saisonnière de l'indice carbonique.

Des faits semblables s'observent dans le sud de l'Indochine, cela ressort en effet de la comparaison d'analyses de l'eau du Don-naï prélevée à Tri-An (environ de Saïgon) en diverses saisons par Saint-Sernin.

Ces analyses datent de 1905, on en trouve le relevé détaillé dans le *Traité d'Hygiène de l'Indochine*, de Grall (p. 134 et suivantes).

Quatre prélèvements successifs ont été faits au même point dans les mêmes conditions. Le 16 mai 1905, au début de la saison des pluies on a :

Acide carbonique	101 milligrammes (litre).
Oxygène dissous	8,79 —

Le degré hydrotimétrique (2) permet de penser qu'il s'agit d'acide carbonique libre.

Le 14 juin 1905, en pleine saison des pluies on a :

Acide carbonique	92
Oxygène dissous	5,59

Le 9 août, à la fin de la saison des pluies :

Acide carbonique	5
Oxygène dissous	2,55

Le 21 novembre, en pleine saison sèche :

Acide carbonique	Traces.
Oxygène dissous	1,65

On voit que des variations notables de CO_2 ont été enregistrées non seulement par rapport aux autres éléments qui restent relativement fixes (sauf le résidu par calcination qui varie du simple au double suivant les saisons et atteint son maximum, évidemment, en pleine saison des pluies) mais même par rapport à l'oxygène dissous, qui varie comme l'acide carbonique mais dans des limites d'une amplitude infiniment plus réduite; l'acide carbonique va en effet de « traces » à 100, l'oxygène de 1,5 à 9 seulement.

Il en résulte que le rapport des gaz dissous varie également dans des proportions étendues ainsi qu'on peut s'en rendre compte d'après le graphique ci-joint.

Très élevé en saison des pluies, il devient égal à l'unité, puis inférieur en saison sèche. Il est assez logique de penser que de telles fluctuations ne doivent pas rester sans influence sur la biologie de la faune aquatique.

On peut même se demander si ces variations du milieu ne sont pas à certaines périodes de l'année suffisantes à elles seules pour expliquer la disparition effective de telle ou telle espèce que l'on observe en faisant des prospections périodiques à Tri-An ainsi que l'un de nous l'a constaté après Borel dès 1928.

Les faits que Guillemin a mis en évidence au sujet de l'*agressivité* des eaux viennent aussi en confirmation des hautes teneurs en CO_2 de certaines eaux en Indochine.

Entre les émergences de haute région dont l'indice carbonique reste haut et le Delta où il s'élève en saison des pluies, les cours d'eau intermédiaires présentent une série de valeurs

décroissantes puis croissantes à nouveau. Le point bas de cette courbe n'a pas pu être déterminé avec certitude encore pour tous les cours d'eau. Il est possible que sa localisation varie quelque peu au cours de la saison. En tous cas, il siège à des hauteurs assez différentes suivant le cours d'eau examiné.

Le Fleuve Rouge par exemple dont l'indice dépasse 100 à Hanoï présente à Phu-Tho un indice de 50 alors qu'il est nul à Yên-Bay et remonte à 14,96 à Lao-Kay, où son affluent le Nam-Thi a déjà atteint le zéro en amont de la ville.

La Rivière Noire de même n'a plus qu'un indice de 28 à la hauteur de Hoà-Binh.

La Rivière Claire dont l'indice en amont du confluent avec le Sông Miên n'est que de 16 tombe à 7,26 en aval de ce confluent et à 0 à Tuyên-Quang.

Le Sông Cầu, indice 70, à Bac-Kan est à 18,6 et 20 à Thai-Nguyễn et 62 à Dap-Câu. Le Sông Calo à Phu-Lo, le Sông Thuong à Phu-Lang-Thuong, points en bordure du Delta, sont encore à 36,12 et 37,84 au début de la saison.

Les chutes de pluies abondantes font encore varier l'indice :

A Thai-Nguyễn, il passe de 20 en mai à 82,4 en septembre ;

A Phu-Lang-Thuong de 37 en mai à 69,52 en septembre.

En résumé, la courbe de l'indice carbonique dans les cours d'eau, régulièrement descendante de la source au Delta pendant la mousson de Nord-Est, présente en saison des pluies un minimum plus ou moins haut situé vers l'amont et un maximum en aval au voisinage de l'entrée dans le Delta.

Tout se passe comme si la zone des hauts indices, d'apparition précoce au sommet du Delta se propageait comme une onde en sens inverse du courant.

L'établissement d'un graphique représentatif n'est possible que pour un temps très limité, s'il doit porter sur une zone étendue. On observe, en effet, des variations notables en un même point pendant la saison de transition que caractérisent des pluies intermittentes et des orages. La distribution des indices ne semble se stabiliser un peu que pendant la période des inondations estivales. Encore observe-t-on en un même lieu une élévation de l'indice au début de l'inondation puis une baisse souvent très marquée. Il serait donc prématuré de conclure et dans l'ensemble l'instabilité des indices de la saison

des pluies s'oppose en ce qui concerne les cours d'eau moyens et grands à la relative stabilité en mousson de Nord-Est. Le fait semble en rapport dans le Delta non seulement avec les précipitations atmosphériques locales, mais encore avec les crues causées par les pluies de la haute région. La variabilité des indices paraît donc en rapport avec la grande irrégularité du régime de ces cours d'eau à cette période. D'autre part, le lieu géométrique des points d'indice maxima pour un groupe de rivières paraît correspondre à une zone de stagnation relative mobile, variable, suivant le moment et suivant le cours d'eau, mais assez bien définie à chaque période pour chacun d'entre eux.

On est donc conduit à envisager une action différente des eaux sur les terres des berges ou du lit des fleuves tonkinois suivant le mode et la durée du contact.

L'étude expérimentale de ce processus fera l'objet d'un autre travail.

Le Gérant : G. MASSON.